

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. G.A. Martini)

LYMPHOZYTOTOXISCHE AUTOANTIKÖRPER BEI
PATIENTEN MIT LEUKOPENIE UND DIE BEEINFLUSSUNG
DER LYMPHOZYTENMISCHKULTUR (MLC) DURCH
ANTIKÖRPER GEGEN LYMPHOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

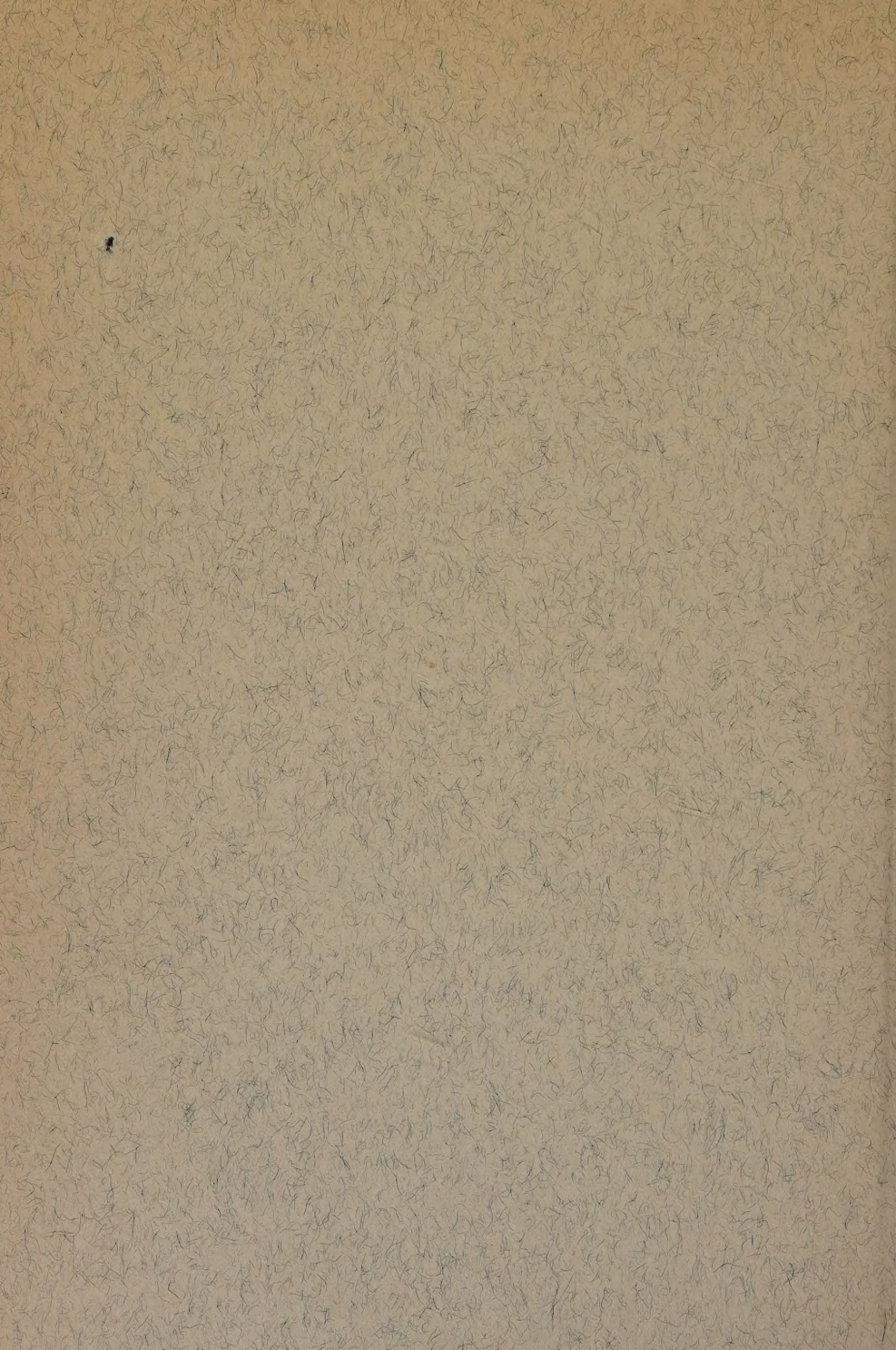
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERHARD MOLDENHAUER

aus Arolsen

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini)

LYMPHOZYTOTOXISCHE AUTOANTIKÖRPER BEI
PATIENTEN MIT LEUKOPENIE UND DIE BEEINFLUSSUNG
DER LYMPHOZYTENMISCHKULTUR (MLC) DURCH
ANTIKÖRPER GEGEN LYMPHOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERHARD MOLDENHAUER

aus Arolsen

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 17.12.1976
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Malchow
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. W. Ax

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung	
1.1.0 Allgemeines	1
1.2.0 Lymphozyten	2
1.3.0 Antikörper gegen Lymphozyten	4
2. Methoden und Materialien	
2.1.0 Der Microcytotoxizitätstest	7
2.2.0 Die Lymphozytenmischkultur (MLC)	15
2.3.0 Rheuma-Faktor	22
2.4.0 Antinukleäre Faktoren	23
2.5.0 Kälteagglutinine	24
2.6.0 Patienten und Fragestellung	24
3. Ergebnisse	
3.1.0 Variation des Microcytotoxizitätstests	26
3.2.0 Lymphozytotoxische Autoantikörper	32
3.3.0 Waaler-Rose-Test, R-F, LE-F und Kälteagglutinine	34
3.4.0 Antikörper gegen homologe Lymphozyten	35
3.5.0 Beeinflussung der MLC Reaktion durch lymphozytotoxische Antikörper	38
4. Diskussion	
4.1.0 Methode Microcytotoxizitätstest	45
4.2.0 Charakterisierung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers und Abgrenzung gegenüber HL-A Antikörpern	47
4.3.0 Lymphozytotoxische Autoantikörper und Erkrankung	50
4.4.0 Lymphozytotoxische Autoantikörper und serologische Parameter	52
4.5.0 Beeinflussung der MLC durch lymphozyto- toxische Antikörper	54

4.6.0 Zur biologischen Bedeutung lymphozyto- toxischer Autoantikörper; Hypothesen	57
5. Zusammenfassung	62
6. Tabellen	64
7. Literaturverzeichnis	90

1. EINLEITUNG.

1.1.0 Allgemeines:

Bei der Auseinandersetzung mit antigenen Strukturen stehen dem menschlichen Organismus zwei immunologische Systeme zur Verfügung: die unspezifische und die spezifische Abwehr. Beide Abwehrarten können weiter in zelluläre und humorale Mechanismen unterteilt werden (48,56,83,101).

Die unspezifische zelluläre Abwehr umfaßt Phagozytosevorgänge durch Makro- und Mikrophagen. Zu den im Serum vorhandenen unspezifischen Abwehrstoffen zählt z.B. Interferon (27,96,112).

Die spezifische zelluläre und humorale Abwehr zeichnet sich demgegenüber durch enge biochemische Beziehung des immunisierenden Antigens und der darauf erfolgenden Immunantwort aus. Diese enge Beziehung wird als Spezifität bezeichnet. Als morphologisches Substrat können der zellulären spezifischen Abwehr die T-Lymphozyten und der humoralen spezifischen Abwehr die B-Lymphozyten zugeordnet werden. Die Funktionstüchtigkeit beider Immunsysteme ist an die Unversehrtheit der immunkompetenten Zellen gebunden (28,65,84).

Als Antigene werden Substanzen bezeichnet, die in der Lage sind, eine Immunantwort auszulösen. Das Charakteristikum eines Antigens ist das Vorhandensein einer antigenen Determinante. Darunter wird eine Oberflächenstruktur besonderer sterischer und chemischer Konfiguration verstanden. Zweckmäßigerweise unterscheidet man Antigene, die durch ihr alleiniges Vorhandensein eine Immunantwort auslösen können (Immunogene), von solchen, die nur mit Hilfe anderer Trägermoleküle eine entsprechende Wirkung entfalten (z.B. Haptene). Beide tragen zwar eine antigenen Determinante, unter-

scheiden sich jedoch in der Molekülgröße. Das heißt, zur Auslösung einer spezifischen Immunantwort ist ein genügend hohes Molekulargewicht erforderlich (36). Werden immunkompetente B-Lymphozyten durch Antigene stimuliert, so kommt es nach Transformation zur Bildung spezifischer Antikörper. Diese werden in das Plasma abgegeben und sind hier als Immunglobuline nachweisbar. Sie können nach chemisch-physikalischen Kriterien in 5 Klassen unterteilt werden (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM). Eine ältere Einteilung beruht auf funktionellen Merkmalen (Präcipitine, Agglutinine, Antitoxine und andere)(26,84).

Ein universelles Hilfssystem bei Antigen-Antikörper-Reaktionen stellt das Komplement dar. Hierunter fallen mindestens 11 Serum-Faktoren, die in nacheinander geschalteter Reaktionsfolge verschiedenartige Sekundär-Reaktionen auslösen können. Sie sind nicht spezifisch, sondern bilden funktionell eine "gemeinsame Endstrecke" etlicher Immunreaktionen. Aktivierung von Komplement kann zur Lyse von Membranen führen, an welchen sich Antigen-Antikörper-Komplexe angelagert haben (Hämolyse, Bakteriolyse, lymphozytotoxische Reaktion)(80).

1.2.0 Lymphozyten:

Die Lymphozyten stellen keine einheitliche Zellpopulation dar. Man unterscheidet heute mit Hilfe serologischer Methoden zwischen B- und T-Lymphozyten (41, 92).

Die T-Lymphozyten werden durch den Thymus oder vielleicht durch ein thymogenes Hormon geprägt. Dagegen differenzieren sich die B-Lymphozyten unter dem Einfluß eines postulierten Organs, das der Bursa Fabricii der Vögel entspricht. Eine andere Theorie

nimmt das Knochenmark als Determinationsort an (1). Für die spezifische zelluläre Immunität sind die T-Lymphozyten verantwortlich. Sie umfaßt die Allergie vom Spättyp (delayed hypersensitivity), die Transplantatabstoßung (graft rejection), die Immunüberwachung (immune surveillance) und die Graft-versus-Host-Reaktion. Dagegen sind die B-Lymphozyten für die Bildung von Immunglobulinen zuständig, die in die Körperflüssigkeiten abgegeben werden (30). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß B-Lymphozyten auch Funktionen übernehmen, die anfänglich ausschließlich T-Lymphozyten zugeschrieben wurden.

Morphologisch lassen sich B- und T-Lymphozyten nicht eindeutig voneinander abgrenzen. Das Vorkommen von großen und kleinen Lymphozyten ist lediglich Ausdruck eines geänderten funktionellen Zustandes. Eine Trennung gelingt aber aufgrund von Oberflächenmarkern, die für jede Population charakteristisch sind (23). B-Lymphozyten zeigen einen dichten Immunglobulin-Besatz. In der Regel trägt jeder Lymphozyt jeweils nur Moleküle einer Globulinklasse auf seiner Oberfläche am häufigsten IgG und IgM (47,87). Außerdem besitzen B-Lymphozyten einen Komplement-Rezeptor (75), einen Fc-Rezeptor (37) und einen Rezeptor für das Epstein-Barr-Virus (57).

T-Lymphozyten haben die Eigenschaft, mit Schäferythrozyten spontan Rosetten zu bilden (7). Mit menschlichen Erythrozyten konnte eine Bindung nur nach Neuraminidase-Behandlung der Erythrozyten nachgewiesen werden (10). Die Existenz von β_2 -Mikroglobulin wird als weiterer T-Lymphozyten-Marker angesehen (45). Ob es sich bei den Rezeptoren der T-Lymphozyten um Immunglobuline handelt, ist noch nicht endgültig geklärt (72,111).

Die Rezeptoren sind nicht statisch auf der Lymphozyten-

membran vorhanden, sondern einem ständigen Turnover unterworfen (93,111).

Die biologische Bedeutung der Lymphozytenrezeptoren besteht darin, daß mit ihnen Antigene offenbar erkannt und gebunden werden (92,117).

1.3.0 Antikörper gegen Lymphozyten:

Drei Arten von Antikörpern gegen Lymphozyten sind bislang beim Menschen beschrieben worden. Allen dreien ist gemeinsam, daß sie unter Komplementeinwirkung in vitro zur Lyse der Lymphozytenmembran führen. Es handelt sich somit um lymphozytotoxische Antikörper. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Spezifität und ihrer biologischen Bedeutung.

1.3.1 Natürliche Antikörper gegen "verborgene" Membranbestandteile:

Im Serum von gesunden menschlichen Individuen konnte ein Antikörper nachgewiesen werden, der gegen Neuraminidase-behandelte Lymphozyten gerichtet ist (Rosenberg et al. 1972). Er reagiert sowohl mit autologen als auch mit homologen Lymphozyten. Die Reaktion ist komplementabhängig.

Durch die Neuraminidase-Behandlung wird ein Teil der Sialinsäure aus der Lymphozytenmembran entfernt, die Lebensfähigkeit der Zelle jedoch nicht beeinflußt. Vermutlich treten dadurch sonst verborgene Antigene (hidden sites) hervor. Der natürlich vorkommende Antikörper ist mit großer Wahrscheinlichkeit gegen solche Membranbestandteile gerichtet. Er gehört der IgM Immunglobulinklasse an.

Die biologische Bedeutung dieses Antikörpers dürfte

darin bestehen, daß durch ihn gealterte, geschädigte oder allgemein veränderte Lymphozyten eliminiert werden (95).

1.3.2 Antikörper gegen homologe Lymphozyten:

Sensibilisierung mit homologen Zellen (Leukozyten, Lymphozyten, Thrombozyten oder Gewebszellen) führt häufig zum Auftreten von Antikörpern, die gegen genetisch determinierte HL-A Eigenschaften gerichtet sind (4,32,43). Solche Antikörper können im Microcytotoxizitätstest nachgewiesen werden, wenn sie unter Komplementzusatz mit Lymphozyten inkubiert werden, welche die entsprechenden HL-A Antigene besitzen. Bei der Reaktion kommt es zur Lyse der Zellmembran (59, 77,105).

HL-A Antikörper treten nach Schwangerschaften, Bluttransfusionen und Transplantation homologen Gewebes auf (31,38,82,89,110). Dabei muß es aber nicht zwangsläufig zu einer Sensibilisierung kommen. Ob eine Antikörperproduktion auftritt, ist von der antigenen Stärke der betreffenden HL-A Eigenschaft abhängig (86). Die Antikörper gegen HL-A Antigene gehören vorwiegend der IgG Immunglobulinklasse an, es sind aber auch IgM Antikörper beschrieben worden (2,118). Ihr Reaktionsoptimum liegt in vitro zwischen 22°C und 37°C (59,77). Sie sind gegen alle Zellen gerichtet, welche HL-A Antigene tragen und nicht für Lymphozyten spezifisch. Die biologische Bedeutung dieser Antikörper liegt darin, daß sie die Immunantwort auf menschliche Antigene darstellen, die als körperfremd (not self) erkannt wurden. Sie dienen somit der Erhaltung des individuellen genetisch determinierten Antigenmusters. Klinische Bedeutung besitzen solche Antikörper z.B. bei Organtransplantationen. Sie können zu einer per-

akuten Abstoßungsreaktion führen, wenn das Transplantat HL-A Antigene aufweist, gegen die Antikörper im Blut des Empfängers vorhanden sind. Deshalb wird vor jeder Transplantation neben der Typisierung eine Kreuzprobe (cross-match) durchgeführt, um die Existenz von entsprechenden HL-A Antikörpern auszuschließen. Ebenso haben diese Antikörper Relevanz für die Überlebenszeit von transfundierten Leukozyten, Lymphozyten und Thrombozyten (14,120).

1.3.3 Antikörper gegen autologe Lymphozyten:

Lymphozytotoxische Antikörper gegen autologe Zellen sind bisher vorwiegend bei Autoimmunerkrankungen beobachtet worden. Sie kommen aber auch bei anderen Erkrankungen wie Virusinfektionen, Leukämie oder malignen Lymphomen vor. Als Prototyp einer Erkrankung, die mit Bildung von Autoantikörpern gegen Lymphozyten einhergeht, wird der Lupus erythematoses visceralis (LE) angesehen. Das Auftreten solcher Antikörper ist bei dieser Kollagenose besonders häufig und von etlichen Autoren untersucht worden (43,61,62,74,78,79,85,102,106).

Bereits 1951 war von Michael et al. vermutet worden, daß die für den visceralen Erythematoses charakteristische Leukopenie durch Antikörper bedingt sein könnte (73). Miescher beschrieb 1954 eine chronische Leukopenie, die durch Autoantikörper verursacht war (76). Die Untersuchungen von Dausset et al. (1958, 1961) bestätigten die Annahme einer Antikörperbedingten Leukopenie unter Verwendung des Antiglobulin-Konsumptionstests (33,34).

Der Antikörper führt in vitro zu einer komplementabhängigen Lyse sowohl autologer als auch homologer Lymphozyten. Da er mit autologen Zellen reagiert,

handelt es sich um einen Autoantikörper. Er gehört vermutlich der IgM Immunglobulinklasse an (61,68,74). Sein Reaktionsoptimum liegt in vitro bei 15°C (61,62,74,79,85,106).

Über die biologische Bedeutung des beschriebenen Autoantikörpers ist bislang wenig bekannt.

2. METHODEN UND MATERIALIEN.

2.1.0 Der Microcytotoxizitätstest:

Dieser Test wurde 1964 von Terasaki und McClelland eingeführt (105) und ist seitdem mehrfach modifiziert worden (13,59,77). Er dient zur Bestimmung von Histo-compatibilitätsantigenen auf der Oberfläche von Lymphozyten und stellt eine der Standardmethoden in der Transplantationsimmunologie dar.

Dabei werden Seren mit bekannter Anti-HL-A-Spezifität, wie man sie bei Multipara finden kann, mit den zu testenden Lymphozyten unter Komplementzusatz inkubiert. Ist das HL-A Antigen, gegen welches das Antiserum gerichtet ist, auf der Lymphozytenoberfläche vorhanden, so kommt es zu einer komplementabhängigen partiellen Lyse der Lymphozytenmembran, die dann für Farbstoffe bestimmter Molekülgröße durchlässig wird. Die Rate der zerstörten Zellen wird mikroskopisch beurteilt.

2.1.1 Präparation der Lymphozytensuspension mit Hilfe des Ficoll-Isopaque-Gradienten (11,59):

15 ml Venenblut werden unter Vorlage von 200 E. Heparin (Liquemin^R, Hoffmann-La Roche) mit einer 20 ml Einmal-

spritze (Braun, Melsungen) entnommen.

Das Blut wird in einen 50 ml Erlenmeyerkolben gegeben, mit einer Spatelspitze Carbonyl-Eisenpulver (BASF, Ludwigshafen) vermischt und 10 min im Wasserbad bei 37°C langsam in kreisenden Bewegungen geschüttelt. Dabei phagozytieren die Granulozyten die zugesetzten Eisenpartikel und gehen bei den folgenden Schritten ins Sediment.

Das mit Eisenpulver versetzte Blut wird zu gleichen Teilen in zwei 15 ml Glasröhrchen gegeben und mit je 1,5 ml 6%igem Dextran (Macrodex^R 6%, Knoll AG) vermischt. Die beiden Röhrchen werden für 30 min ins Wasserbad bei 37°C gestellt. Dabei sedimentieren die Erythrozyten zum größten Teil aus, ebenso die eisenbeladenen Granulozyten. Die Thrombozyten, die nach Behandlung mit Carbonyl-Eisenpulver auf Granulozyten aggregiert sind, gehen ebenfalls ins Sediment.

Der lymphozytenreiche Überstand wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Glasröhrchen gefüllt.

In Glasröhrchen von 9 mm Durchmesser werden 1 ml Ficoll-Isopaque-Lösung (Ansatz siehe unten) mit 1,5 ml des Überstandes vorsichtig überschichtet und 15 min bei 2200 Upm in der Kühlzentrifuge bei 4°C geschleudert. Die Dichte der Ficoll-Lösung liegt mit 1,077 g/ml zwischen der der Erythrozyten (1,090 g/ml) und der der Lymphozyten (1,060 g/ml). Dadurch werden beide Zellarten durch die Ficoll-Phase getrennt. Die restlichen Erythrozyten und Granulozyten des Überstandes sammeln sich beim Zentrifugieren am Boden des Röhrchens, während die Lymphozyten einen dichten Zellring zwischen Ficoll- und Plasma-Phase bilden. Der Lymphozytenring wird mit der Pasteurpipette kreisförmig abgesaugt. Hierbei muß sehr sorgfältig vorgegangen werden, um eine Aspiration der Ficoll-Lösung in die Pipette zu vermeiden. Sonst kann es möglicherweise zu einer Inter-

ferenz der Rezeptoren auf der Lymphozytenmembran mit der Ficoll-Lösung kommen.

Die so gewonnenen Lymphozyten werden zweimal für 10 min bei Zimmertemperatur (22°C) und 1000 Upm mit 10 ml Medium TC 199 plus Antibiotikazusatz gewaschen (Ansatz des Mediums siehe unten).

Nach dem zweiten Waschen wird das Medium über dem Lymphozytensediment mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellsediment wird einige Minuten stehen gelassen und dann das überschüssige Medium nochmals abgesaugt. Es ist darauf zu achten, daß alle Flüssigkeit über den Zellen entfernt wird.

Dem Lymphozytensediment werden 6 Tropfen AB-Serum zugefügt und die Zellen darin resuspendiert. Das hierbei verwendete AB-Serum stammte von gesunden Spendern, bei denen das Vorhandensein lymphozytotoxischer Antikörper durch Testung sicher ausgeschlossen werden konnte.

Die Lymphozyten werden nach dem mikroskopischen Zählkammerverfahren (Neubauer-Kammer) gezählt und auf eine Zellverteilung von 6000 Lymphozyten pro mm^3 Suspension eingestellt. Die Verdünnung erfolgt mit AB-Serum.

In der Lymphozytensuspension sind praktisch keine Erythrozyten mehr vorhanden. Der Anteil von Granulozyten liegt in der Regel unter 5%.

Herstellung der Ficoll-Isopaque-Lösung (59):

Auf einer Analysenwaage werden 9,556 g Ficoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) abgewogen und zusammen mit 130,4 ml Aqua bidest und 20 ml Ronpacon^R 75% (Cilag-Chemie, Alsbach) in ein Becherglas gegeben.

- Auf einem Magnetrührer wird die Lösung so lange durchgemischt, bis sie keine ungelösten Partikel mehr enthält und völlig klar ist.

Herstellung von Medium TC 199 mit Antibiotikazusatz (im Folgenden abgekürzt TC 199 plus P+S):

Der Ansatz erfolgt unter sterilen Kautelen. Zu 890 ml Aqua bidest werden hinzugefügt 100 ml TC Medium 199, 10X (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) und 10 ml TC Sodium Bicarbonate Solution 10% (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Als Antibiotika werden einem Liter Medium 100 000 E. Penicillin (Penicillin "Grünenthal", Chemie Grünenthal, Stolberg) und 100 mg Streptomycin (Bayer, Leverkusen) zugesetzt. Die Ficoll-Lösung und das TC Medium werden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und sind regelmäßig auf Verunreinigungen -insbesondere Pilz- und Bakterienbewuchs- zu kontrollieren.

2.1.2 Der Microcytotoxizitätstest nach Kissmeyer-Nielsen und Kjerbye (59); zur Zwei-Phasen-Methode modifiziert nach Klingelhöfer und Malchow (60,61):

Die Durchführung der Reaktion erfolgt in rechteckigen Plastikkammern (Microtrays, Coates Logos, Moss, Norwegen) mit einer Kantenlänge von 80X53 mm, die einen 0,17 mm starken, optisch klaren Glasboden besitzen. Er wird durch 18 schwarze Kreismarkierungen mit einem Innendurchmesser von 5 mm und leicht erhabenen Randwall unterteilt. Die ringförmigen Aufdrucke sind in 3 Reihen (A,B,C) zu je 6 Feldern (1-6) verteilt. Vor Gebrauch der Platten wird der Glasboden mit 96%-igem Alkohol abgerieben und die Kammer mit 3 ml flüssigem Paraffin (Merck, Darmstadt) gefüllt. So wird ein Austrocknen der Testansätze verhindert. Bei der Bestimmung von HL-A Antigenen auf der Lymphozytenoberfläche werden 1 µl eines spezifischen Antiserums mit 1 µl der eingestellten Lymphozytensuspension

pro Testfeld eingefüllt. Nach 30 minütiger Vorinkubation bei Zimmertemperatur erfolgt Zusatz von 2 μ l Komplement je Ansatz. Anschließend Inkubation der Platten für 60 min im Brutschrank bei 37°C. Danach werden je 0,5 μ l einer 1%igen Trypanblaulösung zu den Testansätzen hinzugegeben. 30 min nach Zusatz der Farblösung kann die Reaktion im Umkehrmikroskop abgelesen werden.

Sollen hingegen im Serum zirkulierende Antikörper gegen autologe oder homologe Lymphozyten bestimmt werden, so wird folgendermaßen vorgegangen:

Die zu testenden Seren werden zu je 1 μ l (0,001 ml) in die Mitte eines schwarz umrandeten Testfeldes unter das Paraffin pipettiert. Zu dem Serum wird 1 μ l der eingestellten Lymphozytensuspension (6000 Zellen) hinzugefügt und vermischt. Dann läßt man die Platten 30 min lang bei Zimmertemperatur (22°C) zur Vorinkubation stehen.

Danach werden in jedes Feld 2 μ l Kaninchen-Komplement (Behringwerke, Marburg) zugegeben. Das Komplement wird in lyophilisierter Form vertrieben und erst kurz vor Gebrauch in Aqua dest gelöst; es besitzt keinen zelltoxischen Effekt. Unter kreisenden Bewegungen werden die Platten etwa 3 min langsam geschüttelt. Anschließend Inkubation bei 15°C für 3 Stunden. Hierzu wird eine durchströmte Kammer aus Kupferblech verwendet, die an ein mit Thermostat geregeltes Wasserbad angeschlossen ist. Das Wasserbad kann mit einem Thermo-Aggregat sowohl gekühlt als auch erwärmt werden. Mittels einer eingebauten Pumpe wird die Kupferblechkammer ständig mit Wasser konstanter Temperatur perfundiert.

Je 0,5 μ l einer 1%igen Trypanblaulösung werden dann zu den Testansätzen pipettiert. Diese Farblösung wird hergestellt, indem man von einer 2%igen Trypanblau-

lösung (Chroma-Gesellschaft Schmidt & Co, Stuttgart-Untertürkheim) ausgeht und sie zu gleichen Teilen mit 1,8%iger NaCl-Lösung vermischt und 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu entfernen. Die Platten werden wiederum langsam kreisend bewegt und 30 min bei Zimmertemperatur (22°C) stehen gelassen. Auf die Ölschicht wird ein Deckglas 53 X 28 mm gelegt und mit einer Hakennadel vorsichtig angedrückt, so daß sich das Paraffinöl über dem Deckglas verteilt. Dabei werden die Reaktionstropfen flächenhaft ausgebreitet.

Von Antikörpern unter Komplementeinwirkung zerstörte Lymphozyten färben sich durch Trypanblau an, während unzerstörte Zellen farblos bleiben. Die Ablesung der Reaktion erfolgt im Umkehrmikroskop (Carl Zeiss, Wetzlar). Es werden mehrere Gesichtsfelder angesehen. Die Beurteilung geschieht nach dem Prozentsatz der zerstörten Zellen.

0 - 9 %	= 0	= negativ
10 - 14 %	= 1	= zweifelhaft
15 - 24 %	= 2	= schwach positiv
25 - 49 %	= 3	= positiv
50 - 74 %	= 4	= stark positiv
75 - 100 %	= 5	= sehr stark positiv

Zum Einfüllen der Seren, der Lymphozytensuspension, des Komplements sowie der Trypanblaulösung in die Testplatten werden zweckmäßigerweise eine 50 µl (für Serum, Suspension und Komplement) und eine 25 µl (für Trypanblau) Hamilton-Micreliter-Spritze mit stumpf geschliffener Nadel und Dosiervorrichtung (Hamilton Micromessure, Den Haag, Niederlande) verwendet. Die Dosiervorrichtung ermöglicht das exakte Ausstoßen von genau 1 µl (50 µl Spritze) bzw. 0,5 µl (25 µl Spritze)

bei einmaliger Betätigung des Dosierdruckknopfes.

2.1.3 Zwei-Phasen-Microcytotoxizitätstest nach Mittal et al. (77):

Die Lymphozytengewinnung erfolgt nach der Ficoll-Iso-
paque Methode. Nach dem zweiten Waschen der Zellen
werden diese allerdings nicht in AB-Serum aufgenommen,
sondern in 6 Tropfen TC 199 plus P+S mit 10% Kälber-
serum (Behringwerke, Marburg) resuspendiert. Die
Zellzahl wird auf 2000 Zellen pro mm^3 Zellsuspension
eingestellt. Zur Verdünnung wird ebenfalls Kultur-
medium bestehend aus TC 199 plus P+S mit 10% Kälber-
serum verwendet.

Die Reaktion wird in rechteckigen Polystyrol-Kammern
(Microtest Tissue Culture Plates, Falcon Plastics,
Los Angeles, California, USA) der Größe 80×55 mm
durchgeführt. In dem optisch klaren Boden der Platten
befinden sich 60 runde Vertiefungen mit erhabenen
Randwall und flachem Boden. Die Löcher haben in Höhe
des Randwalls einen Innendurchmesser von 4 mm und
verjüngen sich nach unten, so daß sie dem Abdruck eines
Kegelstumpfes mit nach oben gekehrter Grundfläche
gleichen; ihre Tiefe beträgt 2 mm. Die 60 Testlöcher
sind in 6 Reihen (A-F) zu je 10 Vertiefungen (1-10)
verteilt.

Nach Abreiben der Testplatten mit 96%igem Alkohol
werden diese mit Paraffinöl derart überschichtet, daß
nur die ausgestanzten Vertiefungen gefüllt sind. Je
1 μl des zu testenden Serums wird in eines der dafür
vorgesehenen Löcher pipettiert. Zu dem Serum wird je
1 μl der eingestellten Lymphozytensuspension (2000
Zellen) hinzugefügt. Beide Tropfen werden unter dem
Paraffinöl miteinander vermischt. Zur Vorinkubation

läßt man die Platten 45 min bei Zimmertemperatur (22°C) stehen.

Danach werden zu jedem Testansatz 5 µl Kaninchen-Komplement zugegeben. Anschließend Inkubation der Platten für 3 Stunden bei 15°C.

Anfärben der lysierten Zellen mit 3,3 µl 5%iger wäßriger Eosinlösung pro Testfeld. Die Lösung wird hergestellt, indem Eosin gelblich (Merck, Darmstadt) in physiologischer NaCl-Lösung aufgelöst und mit Natronlauge oder Essigsäure auf pH 7 eingestellt wird. Vor Gebrauch 5 min bei 2000 Upm zentrifugieren, damit sich ungelöste Partikel absetzen. Zur Beendigung der Reaktion werden nach 2 min je 6,6 µl 35-40%ige Formalinlösung zu den Testansätzen hinzu pipettiert (Formaldehyd-Lösung p. A. 35-40%ig, Riedel). Mit Natronlauge oder Essigsäure vor Gebrauch auf genau pH 7 einstellen.

Anschließend wird ein Deckglas 45 X 72 mm auf den Boden der Testplatte gelegt. Die Reaktion wird mit einem Umkehrmikroskop im Phasenkontrast abgelesen. Lysierte Zellen erscheinen dabei dunkel im Gegensatz zu den mit einem Lichthof hell aufleuchtenden intakten Lymphozyten. Die Beurteilung erfolgt wie bei der Methode nach Kissmeyer-Nielsen et al.

Zum Einfüllen der Zellsuspension und der Seren wurde eine 50 µl Hamilton-Spritze mit Dosiervorrichtung verwendet (Repeating Dispenser PB 700 von Hamilton). Für die Komplementzugabe wurde ein Terasaki Dispenser (Hamilton Micromeasure, Den Haag, Niederlande) benutzt. Es handelt sich hierbei um eine -speziell für die Gewebstypisierung mit Micro Test Plates entwickelte Kombination von 6 modifizierten PB 700 Spritzen mit gemeinsamer Dosiervorrichtung. Das Gerät erlaubt den simultanen Zusatz gleicher Komplementmengen in 6 Löcher einer Reihe auf den Testplatten.

Eosin- und Formalinlösung wurden ebenfalls mit je einem Micro Dispenser (C.A. Greiner und Söhne, Nuer-tingen) pipettiert. Eine 1 ml Tuberkulin-Spritze (Ein-malspritze) wird hierzu mit einer Dosiervorrichtung versehen; mit Hilfe eines Verteilerkopfes können gleiche Flüssigkeitsmengen in die 6 Vertiefungen einer Reihe der Testplatte geleitet werden. Einmalige Be-tätigung des Dosierdruckknopfes setzt ein Volumen von 3,3 µl pro Loch frei.

2.2.0 Die Lymphozytenmischkultur (Mixed Lymphocyte Culture, MLC):

Seit Erstbeschreibung der Lymphozytenmischkultur durch Hirschhorn et al. 1963 (55), Bain et al. 1964 (9) und Bach et al. 1964 (5) hat sich dieses Testsystem als eine der bedeutsamsten in vitro Methoden zur Erforschung der zellulären Immunität etabliert. Die Durchführung der Reaktion ist heute weitgehend standardisiert (8, 12,39,90,98). Die MLC-Methode wird bei einer ganzen Reihe von Fragestellungen herangezogen. So findet sie Anwendung in der Histocompatibilitätstestung (3,6,35, 90), in der Tumorummunologie (51,67,81) und zum Nach-weis einer gestörten zellulären Immunität, wie sie bei konnatalen Immunopathien (40,91) und bei Auto-immunerkrankungen (54,67) vorkommt.

Prinzip der MLC: Werden periphere Lymphozyten zweier genetisch verschiedener Individuen gemischt in Kultur gehalten, so kommt es zu einer gegenseitigen Stimu-lation. Die Lymphozyten werden dabei transformiert und zur Zellteilung angeregt. Der Grad der Transfor-mation und damit auch der Stimulation wird durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins in die Lympho-zyten-DNS gemessen.

Die Reaktion kann grundsätzlich in zwei Variationen ausgeführt werden:

1) Gegenseitige Stimulation der beiden Lymphozytenarten. Jeder Lymphozyt wirkt dabei sowohl als Stimulator- als auch als Antwort-Zelle. Diese Methode wird als "bidirectional MLC reaction" oder "two-way-stimulation" bezeichnet.

2) Durch Behandlung einer Lymphozytenart mit Mitomycin C, das die DNS Reduplikation verhindert, werden diese Zellen einseitig in ihrer Antwortfähigkeit gehemmt. Die Mitomycin C behandelten Lymphozyten können dann nur noch stimulieren (stimulator), während nur die unbehandelten Zellen antworten (responder). Diese Variation, bei der die Rolle der Reaktionspartner von vornherein festgelegt ist, wird "unidirectional MLC reaction" oder "one-way-stimulation" genannt.

Neben der Stimulation durch genetisch determinierte Antigendifferenzen kann eine Lymphozytentransformation auch durch unspezifische Mitogene (z.B. Phytohämagglutinin) hervorgerufen werden (71).

Wir verwendeten ein Testsystem, mit dem der Einfluß von Serumfaktoren auf die MLC-Reaktivität beurteilt werden kann. Hierzu wurden Lymphozytenmischkulturen mit den Zellen zweier gesunder, genetisch differenter Spender angesetzt. In einem Vorversuch wurde sichergestellt, daß beide Lymphozytenpopulationen eine gute Stimulierbarkeit erbrachten. Die Kulturansätze wurden mit Patientenserum bekannter lymphozytotoxischer Potenz inkubiert. Die Beurteilung des inhibitorischen oder stimulatorischen Effekts der Serumproben auf die MLC-Reaktivität erfolgte in Relation zu einem vorgetesteten AB-Serum.

Die MLC wurde in einer Mikrokultur-Technik ausgeführt, die eine teilautomatisierte Aufarbeitung der Testansätze erlaubt. Diese Methode bietet verschiedene Vorteile gegenüber den sonst verwendeten Makro-Kulturen.

2.2.1 Gewinnung und Reinigung der Lymphozyten:

Die Präparation der Lymphozytensuspension wird mit Hilfe des Ficoll-Isopaque-Gradienten (11,108) durchgeführt.

Zwei gesunden freiwilligen Spendern (A und B) mit der Blutgruppe O Rhesus positiv werden je 60 ml Venenblut entnommen. Dazu werden 20 ml Plastik-Einmalspritzen (Braun, Melsungen) unter Vorlage von 300 E. Heparin (Liquemin^R, Hoffmann-La Roche) verwendet. Die Spritzen werden mit sterilen Einmalkanülen und Schutzhülle verschlossen. Im Brutschrank bei 37°C werden sie in einem Winkel von 70°-90° so hingestellt, daß die Kanüle nach oben zeigt. Inkubation für 1-2 Stunden. Die Erythrozyten sedimentieren dabei und es bildet sich eine leukozytenreiche Plasmazone über dem Sediment.

Etwa 10 ml Ficoll-Isopaque-Lösung werden in ein verschließbares 50 ml Einmal-Zentrifugenröhrchen aus Plastik (Falcon, Oxnard, California, USA) vorgelegt. Die Lösung wird mit dem Überstand vorsichtig überschichtet. Dazu stellt man das Zentrifugenröhrchen schräg auf, biegt die Kanüle an der Spitze um, legt sie der Innenwand des Röhrchens an und spritzt das leukozytenreiche Plasma langsam aus. Pro Röhrchen mit 10 ml Ficoll-Lösung können ca. 30 ml Überstand zugegeben werden.

Die Zentrifugenröhrchen werden dann mit einem passenden Plastik-Schraubdeckel verschlossen und 20 min in der Kühlzentrifuge bei 2200 Upm und 4°C geschleudert. Dabei werden noch im Überstand verbliebene Erythrozyten von

den Lymphozyten getrennt. Zwischen der Ficoll- und der Plasmaphase bildet sich ein dichter Lymphozytenring. Mit einer Pipette werden die Zellen durch die Plasmaphase hindurch abgesaugt und in ein bereitstehendes Zentrifugenröhrchen gefüllt. Anschließend zweimaliges Waschen in Medium TC 199 plus P+S bei 1200 Upm und Zimmertemperatur (22°C). Nach dem zweiten Waschen Resuspension der Lymphozyten in je 10 ml Medium TC 199 plus P+S.

Mit dem mikroskopischen Zählkammerverfahren wird die Zellzahl beider Suspensionen (Spender A und B) bestimmt. Die Ausbeute liegt bei dieser Methode der Zellgewinnung um 1×10^6 Lymphozyten pro 1 ml Blut. Der Anteil an Granulozyten ist in der Regel kleiner als 10%. Es wird von jeder Zellart eine Suspension hergestellt, die in 1 ml Volumen $1,5 \times 10^6$ Lymphozyten enthält. Die Verdünnung erfolgt wieder mit TC 199 plus P+S. Die Präparation der Zellsuspension wird unter sterilen Kautelen durchgeführt.

2.2.2 Ansetzen der Kultur (15,53,88):

Die Kulturen werden in Micro Test II Tissue Culture Plates (Falcon Plastics, Oxnard, California, USA) ausgeführt. Diese Kulturplatten sind aus durchsichtigem, nicht zelltoxischem Polystyrol gefertigt, besitzen 96 Testlöcher und einen flachen Boden. Der Durchmesser eines Loches beträgt 6 mm, die Tiefe 10 mm. Ein Loch faßt maximal ein Volumen von 0,36 ml. Angeordnet sind die Testlöcher in 8 Reihen (A-H) zu je 12 (1-12). Die Platten werden steril verpackt geliefert. Zur Inkubation können die Testplatten mit einem passenden Polystyroldeckel (Micro Test II Lid von Falcon) steril verschlossen werden.

Grundsätzlich wird jedes Loch der Testplatte mit

$0,3 \times 10^6$ Zellen und 0,03 ml Serum oder Plasma gefüllt. Diese Zellzahl ist in einem Volumen von 0,2 ml der eingestellten Suspension enthalten. Sollen Zellen A und B eingefüllt werden, so pipettiert man 0,1 ml Suspension A ($= 0,15 \times 10^6$ Zellen A) und 0,1 ml Suspension B ($= 0,15 \times 10^6$ Zellen B). Will man hingegen nur eine Zellsorte einfüllen, so pipettiert man 0,2 ml ($= 0,3 \times 10^6$ Zellen) der betreffenden Lymphozytensuspension. Als Kontrolle und zur Beurteilung der unbeeinflussten MLC Reaktion wird auf jeder Platte ein Standardversuchsansatz durchgeführt:

- 1) Zellen A+B und Plasma A
- 2) Zellen A+B und Plasma B
- 3) Zellen A+B und vorgetestetes AB-Serum
- 4) Zellen A und Plasma A
- 5) Zellen B und Plasma A
- 6) Zellen A und Plasma B
- 7) Zellen B und Plasma B

A und B repräsentieren hier die beiden Lymphozyten-spender. Plasma der beiden Spender wird erhalten durch hochtouriges Zentrifugieren des Erythrozytensediments aus den Spritzen. Bei dem AB-Serum handelt es sich um ein Serum, bei dem durch Vortestung eine Beeinflussung der MLC Reaktion ausgeschlossen werden konnte (AB-Serum für die MLC, Behringwerke, Marburg).

Die Ansätze 1 bis 3 werden in 6-fach Werten angelegt, die Ansätze 4 bis 7 in 3-fach Werten. Somit verbleiben für die eigentlichen Testansätze mit Patientenserum 66 Löcher. Da diese Ansätze als 6-fach Kontrollen ausgeführt werden, können also pro Platte 11 Seren untersucht werden. Hierzu werden pro Loch 0,2 ml Suspension A+B ($= 0,15 \times 10^6$ Zellen A plus $0,15 \times 10^6$ Zellen B) und 0,03 ml des zu testenden Serums pipettiert.

Ansetzen der Kulturen wiederum unter sterilen Beding-

gungen. Die aus je 60 ml Blut isolierten Lymphozyten beider Spender sind ausreichend zum Füllen von 3 Testplatten. Es können somit 33 Seren auf ihre Beeinflussung der MLC Reaktion in einem Versuch untersucht werden. Zum Einfüllen der Lymphozytensuspension und des Plasmas bzw. Serums werden Eppendorf Pipetten (Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg) mit sterilen Einmal-Pipettenspitzen benutzt.

Die Testplatten werden mit dem passenden Deckel verschlossen. Inkubation für 7 Tage (= 168 Stunden) bei 37°C in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und konstantem CO₂-Gehalt (5% CO₂ in Luft).

2.2.3 Thymidinzugabe, Kulturabbruch und Auszählung (52,109):

Einen Tag vor Abbruch der Kultur (also nach 144 Stunden Kulturdauer) Zugabe von Thymidin-2-¹⁴C (spezifische Aktivität 6,25 Ci/mMol, NEN Chemicals, Dreieichenhain/Frankfurt). Pro Kulturansatz werden 0,075 µCi in 0,05 ml mit einer Eppendorf Pipette pipettiert. Das radioaktiv markierte Thymidin wird in den folgenden 24 Stunden Kulturdauer in die DNS der stimulierten Lymphozyten eingebaut.

Kulturabbruch (nach 168 Stunden) mit Hilfe eines halbautomatischen Aufarbeitungsgerätes (Multiple Automated Sample Harvester = MASH; MASH II von Dynatech Deutschland, Nuertingen). Dabei werden 24 Kulturansätze simultan abgesaugt und die Zellen von der Kulturflüssigkeit abfiltriert. Durch mehrfaches Ausspülen gelingt es, einerseits nahezu alle Zellen aus den Testlöchern zu entfernen und andererseits ungebundenes ¹⁴C-Thymidin von dem Filter zu eliminieren.

Der MASH II Apparat besteht im wesentlichen aus 3

Funktionsteilen: einer Saug- und Wascheinheit, einer Filtereinheit und einer Filtratsammelungs- und Unterdruckeinheit. In einer Kammer wird mittels Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck erzeugt. In die Kammer münden 24 Kanülen, welche über dünne Schläuche mit der beweglichen Saug-Wasch-Einheit verbunden sind. In das System ist ein Filterblock zwischengeschaltet. Die Saug-Wasch-Einheit besteht aus 24 Doppelkanülen, die in einen Kunststoffriegel eingelassen sind. Die Kanülen sind so angeordnet, daß gleichzeitig 2 Reihen (zu je 12 Löchern) der Testplatte abgesaugt und gespült werden können. Jeweils ein Röhrchen der Doppelkanüle saugt den Kulturansatz ab, während durch das andere Spülflüssigkeit (Aqua dest) in die Testlöcher gepumpt wird. In den Filterblock wird vor jedem Aufarbeitungsvorgang ein rechteckiger Glasfiber-Filterstreifen eingelegt, auf dem sich beim Absaugen der Kulturen die Zellen sammeln und zwar für jeden Kulturansatz einzeln. Die Kulturflüssigkeit, die den Filter passiert, kann in Einzelportionen in der Kammer gesammelt werden. Beim Einspannen des Glasfiberstreifens in den Filterblock werden 24 kreisförmige Areale in den Filter gestanzt. Je ein solches Areal enthält nach Absaugen und Spülen die Lymphozyten eines Testansatzes. Die Filterstreifen werden im Brutschrank für 1 bis 2 Stunden getrocknet. Mit einer Pinzette lassen sich die angestanzten runden Filterplättchen aus dem Streifen herauslösen und einzeln in Plastik-Zählgefäße (Werner Zinser Scintillators, Frankfurt) überführen. Zusatz von 10 ml Scintillator-Flüssigkeit (10 g Omnifluor^R auf 2500 ml Toluol; Omnifluor von NEN Chemicals, Dreieichenhain/Frankfurt) zu jedem Filterplättchen. Nach 30 minütiger Kälte- und Dunkeladaptation Auszählung der Proben im Flüssigkeitsscintillationszähler (Liquid Scintillation Spectrometer, Packard Tri-Carb,

Model 3310). Die Aktivität wird für jede Probe in Impulsen pro Minute (counts per minute = Cpm) angegeben und mittels eines Schreibers auf einem Papierstreifen ausgedruckt.

2.3.0 Rheuma-Faktor (RF):

Bei den Rheuma-Faktoren handelt es sich um Autoantikörper gegen körpereigene IgG-Globuline. Die Antikörper selbst gehören vorwiegend der Immunglobulin-klasse IgM an. Der Rheuma-Faktor ist bei der Progression-chronischen Polyarthrit (PcP) in etwa 80% der Fälle nachweisbar. Häufig tritt ein positiver Befund auch bei Kollagenosen und Lebererkrankungen auf (56,99,104).

2.3.1 Waaler-Rose-Test (ASH):

Schäfererythrozyten werden mit Kaninchenambozeptor (Antikörper des Kaninchens gegen Schäfererythrozyten) spezifisch beladen. Sind Rheuma-Faktoren in dem zu testenden Serum enthalten, so reagieren diese mit den Kaninchenantikörpern. Es kommt dabei zu einer Agglutination der Schäfererythrozyten, die als Trägerteilchen in die Reaktion mit einbezogen werden. Es wird diejenige Verdünnung des Patientenserums ermittelt, bei der noch eine Agglutination eintritt. Normaltiter bis 1:16.

2.3.2 RF-Latextest:

Proteinantigene können an der Oberfläche serologisch inerten Träger adsorbiert werden. Antikörper gegen das Protein reagieren spezifisch mit dem aufgetragenen

Antigen. Als Träger haben sich Polystyrol-Latex-Partikel bewährt. Bei positiver Reaktion kommt es zu einer Agglutination der beladenen Partikel.

1 Tropfen des mit Pufferlösung verdünnten Patientenserums wird mit einem Tropfen Latex-RF-Reagenz (z.B. Behringwerke, Marburg) auf einem Objektträger vermischt. Die RF-Reagenz besteht aus einer wäßrigen Suspension von Polystyrol-Latex-Partikeln, die mit Human- γ -Globulin beladen sind.

Beurteilung: Bei makroskopisch sichtbarer Agglutination positiv (pos. und neg. Kontrolle!).

2.4.0 Antinukleäre Faktoren:

Unter den antinukleären Faktoren (ANF) versteht man Antikörper, die gegen verschiedenartige körpereigene Zellkernbestandteile gerichtet sind. Solche Autoantikörper kommen besonders häufig beim visceralen Erythematodes aber auch bei anderen Kollagenosen vor. Der LE-Faktor (Lupus Erythematodes Faktor) ist gegen Desoxyribonukleoprotein gerichtet (44,56,99,104).

2.4.1 LE-Latextest:

Auf einem Glasobjektträger werden 1 Tropfen Patientenserum mit einem Tropfen Testreagenz vermischt. Die LE-Latex-Reagenz (z.B. Hyland-Travenol, München) besteht aus einer Suspension von Latexpartikeln, die mit Kalbsthymus-DNS beschichtet sind. Ist der LE-Faktor im Patientenserum enthalten, kommt es zur Agglutination.

• Beurteilung: Bei makroskopisch sichtbarer Agglutination positiv (pos. und neg. Kontrolle!).

2.5.0 Kälteagglutinine:

Kälteagglutinine stellen Serumfaktoren dar, welche in der Lage sind, Erythrozyten in vivo und in vitro zu agglutinieren. Die Reaktion richtet sich dabei gegen körpereigene zellständige Erythrozytenantigene und ist bei niederen Temperaturen am ausgeprägtesten. Sie sind charakteristisch für die Kälteagglutininkrankheit, treten aber auch im Gefolge von Infektionskrankheiten (z.B. Mykoplasmen-Pneumonien) auf. Diese Autoantikörper gehören überwiegend der Immunglobulinklasse IgM an und zeigen in vitro ein Temperaturoptimum bei 4°C (44,56,104).

2.5.1 Nachweis der Kälteagglutinine:

5 ml Venenblut werden im Brutschrank bei 37°C für mehrere Stunden inkubiert. Dabei lösen sich die an Erythrozyten fixierten Antikörper und gehen ins Serum über. Nach Zentrifugieren wird das Serum abgehoben und eine geometrische Verdünnungsreihe mit physiolog. NaCl-Lösung hergestellt. Erythrozyten eines gesunden Spenders der Blutgruppe O Rhesus positiv werden dreimal in NaCl-Lösung gewaschen. Jedem Röhrchen der Verdünnungsreihe wird ein Tropfen des Erythrozytensediments zugesetzt. Inkubation für 12 Stunden im Kühlschrank bei 4°C. Es wird die Titerstufe bestimmt, bei der noch eine Erythrozytenagglutination makroskopisch sichtbar ist.

Normaltiter: 1:1 bis 1:500

2.6.0 Patienten und Fragestellung:

Es wurden 136 Patienten mit einer Leukopenie unter-

sucht. Die Patienten gehören zu einem allgemein-inter-nistischen Krankengut der Medizinischen Universitäts-klinik Marburg. Die Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte im Rahmen des labordiagnostischen Routine-Pro-gramms der Klinik mit dem Coulter-Counter. Werte unter 4000 weiße Blutkörperchen pro μ l Blut wurden mit der Zählkammermethode überprüft. Eine Leukopenie wurde dann angenommen, wenn auch nach einer Kontrollzählung weniger Leukozyten als 4000/ μ l im Blut vorhanden waren. Bei diesen 136 Patienten wurde das Vorhandensein lympho-zytotoxischer Antikörper bestimmt.

Am Vortage einer Untersuchung wurden diejenigen Patien-ten festgestellt, die entsprechende Leukozytenzahlen aufwiesen. Am nächsten Morgen wurden ihnen 15 ml hepa-rinisiertes Blut zur Lymphozytenisolierung und 20 ml Nativblut zur Serumgewinnung entnommen. Gleich nach der Blutentnahme schloß sich der Test zur Bestimmung der Autoantikörper mit den autologen Zellen an. R-F und LE-F wurden ebenfalls sofort bestimmt. Der Waaler-Rose-Test und die Kälteagglutinine wurden angesetzt und am nächsten Tag das Ergebnis abgelesen.

Pro Versuchstag wurden 1 bis maximal 4 Patienten nach dem angegebenen Schema untersucht. Die Diagnose spielte für die Auswahl der Patienten keine Rolle. Es wurden auch solche Patienten in die Untersuchung aufgenommen, bei denen die Leukopenie ätiologisch geklärt erschien, wie z.B. bei zytostatischer Therapie.

Das verbleibende Serum wurde nach dem Test sofort bei -20°C eingefroren. Es wurde für die Bestimmung von HL-A Antikörpern und für die Untersuchungen zur Beein-flussung der MLC-Reaktion aufgehoben.

Nach Beendigung des Tests wurde Einblick in das Kran-kenblatt des Patienten genommen und die wichtigsten hämatologischen Laborwerte notiert. Der behandelnde Stationsarzt wurde nach der Diagnose befragt.

Da einerseits -wie in der Einleitung dargelegt- bei einigen Krankheiten eine durch Autoantikörper bedingte Leukopenie vermutet wird, andererseits lymphozytotoxische Autoantikörper zytotoxisch auf Lymphozyten wirken und ihre eigentliche pathogenetische Bedeutung noch nicht erkannt ist, wurde die Frage gestellt, wie häufig lymphozytotoxische Autoantikörper bei Leukopenien vorkommen und ob sich aus dem Nachweis dieser Antikörper irgendwelche Gesetzmäßigkeiten ableiten lassen.

Außerdem sollte untersucht werden, welchen Einfluß Seren mit lymphozytotoxischer Aktivität auf die MLC-Reaktion ausüben.

3. ERGEBNISSE.

3.1.0 Variation des Microcytotoxizitätstests:

3.1.1 Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur:

Es wurden 5 Seren untersucht, deren positiver zytotoxischer Effekt bekannt war. Die Seren waren tiefgefroren (-20°C) aufbewahrt worden.

Jede dieser Serumproben wurde in Mehrfachkontrollen mit Lymphozyten von 3 gesunden Spendern bei variierter Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur getestet. Negativkontrollen waren mit AB-Serum mitangesetzt. Die Untersuchung wurde sowohl für die modifizierte Kissmeyer-Nielsen Technik (siehe 2.1.2) als auch für die Methode nach Mittal (siehe 2.1.3) durchgeführt. Die Inkubationstemperaturstufen betrugen 10° , 15° , 22° und 37°C , die Inkubationsdauer wurde für jede Temperatur mit 1, 2, 3 und 4 Stunden variiert. Die Vorinkubations-

dauer (Zeitraum bis zur Komplementzugabe) betrug einheitlich 30 min bei einer Vorinkubationstemperatur von 22°C.

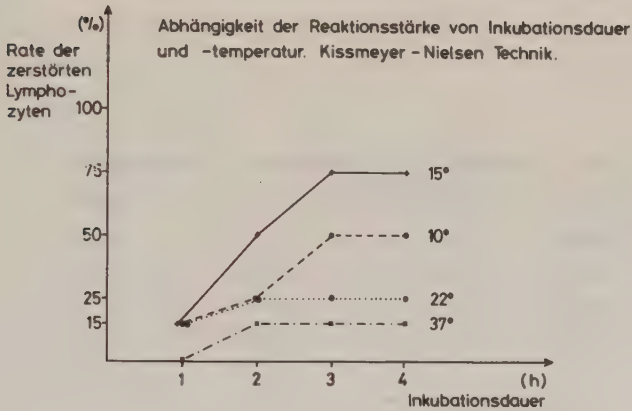


Abb. 1: Erläuterungen siehe Text.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse für die Testung nach der Kissmeyer-Nielsen Technik zusammengestellt. Alle Seren reagierten bei 15°C am stärksten. Die größte Reaktionsstärke wurde dabei nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden erreicht. Längere Inkubation brachte keine weitere Steigerung des lymphozytotoxischen Effekts. Auffällig ist weiter, daß bei höherer Inkubationstemperatur und längerer Inkubationsdauer schwach positive Reaktionen auch in den Negativkontrollen mit AB-Serum auftraten. Besonders deutlich war dieser Effekt bei 37°C und 4 Stunden Inkubationsdauer. Daraus ergibt sich, daß eine längere Inkubationsdauer als

3 Stunden nicht empfehlenswert ist.

Tabelle 2 enthält die Ergebnisse der Testung für die Methode nach Mittal. Auch hier lag das Temperaturoptimum bei 15°C . Inkubationsdauer von 3 Stunden erbrachte maximale Reaktionsstärke. Wiederum traten besonders bei 37°C unspezifisch positive Reaktionen in den Negativkontrollen auf.

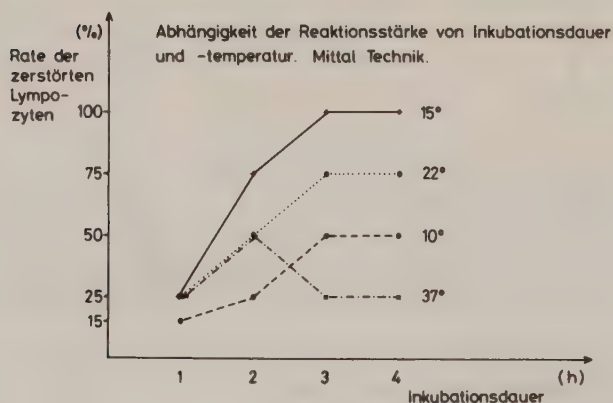


Abb. 2: Erläuterungen siehe Text.

In den Abbildungen 1 und 2 ist die Beeinflussung der Reaktionsstärke durch variierte Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur graphisch dargestellt. Die Verhältnisse bei Testung nach der Kissmeyer-Nielsen Technik zeigt Abb. 1, Abb. 2 gibt das analoge Bild für die Untersuchung nach der Mittal Methode wider. Beiden Abbildungen liegen die Ergebnisse von Serum

Nr. 1 mit Zellen B in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 zugrunde. Beide Abbildungen zeigen deutlich das Temperaturoptimum bei 15°C und maximale Reaktionsstärke nach 3-stündiger Inkubation. Der Knick der 37°C-Kurve bei Inkubationsdauer von 2 Stunden in Abb. 2 ist als Ausdruck einer unspezifisch höher positiven Reaktion zu werten.

Vergleicht man die Reaktionsstärke der einzelnen Seren in beiden Testverfahren, so fällt auf, daß der zytotoxische Effekt unter gleichen Inkubationsbedingungen und unter Verwendung gleicher Zellen bei Testung nach der Mittal Technik größer ist als bei der Kissmeyer-Nielsen Methode. Der Unterschied beträgt in der Regel aber nicht mehr als eine Stufe in der Bewertungsskala. Die Verstärkung der Reaktion ist möglicherweise auf den größeren Komplementanteil bei der Mittal Technik zurückzuführen (Kissmeyer-Nielsen: 2 µl, Mittal: 5 µl Komplement).

3.1.2 Vorinkubationsdauer:

Bei der zur Zwei-Phasen-Methode modifizierten Kissmeyer-Nielsen Technik wird das Komplement erst nach 30-minütiger Vorinkubation bei Zimmertemperatur zugesetzt. Dadurch läßt sich die Empfindlichkeit des Testverfahrens erheblich steigern (60,61). Die Methode nach Mittal et al. ist von vornherein als Zwei-Phasen-Test angelegt (77).

Es sollte untersucht werden, ob sich durch Variation der Vorinkubationsdauer eine Steigerung der Empfindlichkeit erreichen läßt. Dazu wurden wiederum die 5 Seren mit bekanntem zytotoxischen Effekt verwendet. Jedes Serum wurde in Mehrfachkontrollen mit Lymphozyten von 3 gesunden Spendern getestet. Die Zugabe von 5 µl Kaninchenkomplement erfolgte nach 0, 15, 30,

45 und 60 Minuten. Die Vorinkubationstemperatur betrug einheitlich 22°C . Nach Komplementzugabe Inkubation für 3 Stunden bei 15°C .

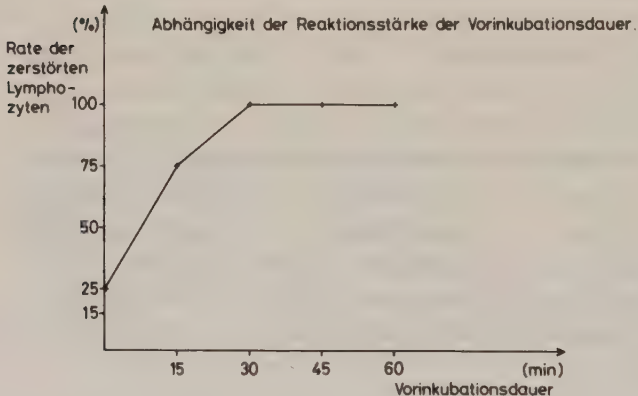


Abb. 3: Erläuterungen siehe Text.

Die Testergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Mit einer Ausnahme wurde die größte Reaktionsstärke nach Vorinkubationsdauer von 30 Minuten erreicht. Lediglich in einem Fall (Serum 3 mit Zellen D) erbrachte 45-minütige Vorinkubation eine stärkere Reaktion. Eine weitere Verlängerung der Vorinkubationsdauer trägt also nicht zur Verstärkung des zytotoxischen Effekts bei. Komplementzugabe nach 30 min Vorinkubation darf analog der modifizierten Kissmeyer-Nielsen Technik als ausreichend betrachtet werden zum Erreichen der maximalen Empfindlichkeit bei Testung nach der Mittal Methode.

In Abbildung 3 ist die Abhängigkeit der Reaktionsstärke von der Vorinkubationsdauer graphisch dargestellt. Der Kurve liegen die Werte von Serum 1 mit Zellen D aus Tabelle 3 zugrunde. Die maximale Reaktionsstärke wird nach 30 min Vorinkubation bei 22°C erreicht. Die Abbildung verdeutlicht zugleich, in welchem Umfang die Empfindlichkeit des Tests durch protrahierte Komplementzugabe gesteigert werden kann. Gegenüber einer Rate der zerstörten Lymphozyten von 25% bei sofortiger Komplementzugabe (Ein-Phasen-Methode) steigert sich der zytotoxische Effekt auf 100% zerstörter Zellen bei Komplementzusatz nach 30 min (Zwei-Phasen-Methode).

Es soll noch auf zwei Faktoren hingewiesen werden, die -wie sich im Verlauf der Untersuchungen herausstellte- zu unspezifisch positiven Ergebnissen führen können. Wird bei Präparation der Zellen nicht sehr schonend vorgegangen, insbesondere beim Resuspendieren und Pipettieren, so kommt es zur mechanischen Schädigung der Lymphozytenmembran. Derart geschädigte Zellen färben sich bei Eosinzugabe dann an. Auch ist der Test empfindlich gegen pH-Schwankungen. Obwohl die Testansätze durch das im Medium enthaltene Bikarbonat gepuffert sind, kann es zur Verschiebung der H^+ Ionen Konzentration beim Hinzufügen von Eosin und Formalin kommen. Die Eosin-Lösung ändert ihren pH-Wert nach längerer Aufbewahrung nur wenig, die Formalin-Lösung allerdings erheblich. Deshalb ist es erforderlich, jeweils vor Zugabe der beiden Lösungen deren pH-Wert zu überprüfen und gegebenenfalls neu einzustellen.

3.2.0 Lymphozytotoxische Autoantikörper:

136 Patienten wurden auf das Vorhandensein lymphozytotoxischer Autoantikörper im Serum untersucht, Doppelbestimmungen nicht eingerechnet. In Tabelle 4 sind alle getesteten Patienten mit Serum-Nr., Initialen, Geschlecht, Alter und Diagnose aufgeführt. Unter der Spalte AUTOLOG ist das jeweilige Ergebnis für Testung mit autologen Lymphozyten angegeben.

Es wurde ausschließlich nach der unter 2.1.3 beschriebenen Methode nach Mittal et al. getestet. Die Bestimmungen erfolgten in 6-fach Kontrollen, eine Negativkontrolle mit vorgetestetem AB-Serum war stets mitangesetzt. Beurteilung der Reaktionsstärke nach der unter 2.1.2 angeführten Stufen-Tabelle.

Bei 14 Patienten konnten lymphozytotoxische Antikörper gegen autologe Zellen nachgewiesen werden. Dabei erbrachten 2 Seren eine zweifelhafte Reaktion (Stufe 1: 10-14% lysierte Zellen). Die verbleibenden 12 Seren reagierten schwach positiv oder stärker (Stufe 2 bis 5: 15-100% abgetötete Zellen). Unter Berücksichtigung auch der zweifelhaften Ergebnisse beträgt der Prozentsatz der Patienten, bei denen Autoantikörper gegen Lymphozyten gefunden wurden, etwa 10%.

Tabelle 5 enthält eine Zusammenstellung der positiven Testergebnisse mit autologen Lymphozyten. Die Patienten sind nach Diagnosegruppen geordnet.

Auffällig bei den Untersuchungen mit autologen Lymphozyten war die Tatsache, daß die als Negativkontrolle konzipierte Testung mit AB-Serum häufig bei den Patienten, deren Serum einen größeren zytotoxischen Effekt aufwies, nicht negativ blieb. Diejenige Reaktionsstärke, die bei Verwendung von Patientenserum und Patientenzellen erzielt wurde, konnte mit AB-Serum und Patientenlymphozyten jedoch nicht erreicht werden.

Das Vorhandensein zytotoxischer Antikörper in dem verwendeten AB-Serum war durch Vortestung ausgeschlossen worden. Dieses Phänomen steht in Einklang zu anderen Untersuchungen und wird zu diskutieren sein.

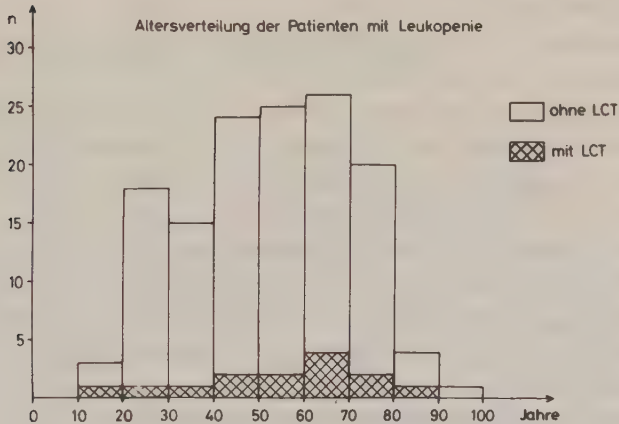


Abb. 4: Altersverteilung der Patienten mit und ohne lymphozytotoxische Autoantikörper (LCT).

Die Altersverteilung der Patienten mit Leukopenie weicht nicht wesentlich von der Altersverteilung der übrigen Patienten im Krankenhaus ab. Auch zeigen die Patienten mit den lymphozytotoxischen Autoantikörpern keine besondere Häufung in einer der aufgetragenen Altersklassen.

3.3.0 Waaler-Rose-Test, R-F, LE-F und Kälteagglutinine:

Bei allen untersuchten 136 Patienten wurden ASH, R-F, LE-F und der Kälteagglutinin-Titer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angeführt.

Es fanden sich insgesamt 16 Seren, bei denen der Titer im Waaler-Rose-Test höher als 1:16 war. Von den 14 Patienten mit lymphozytotoxischen Autoantikörpern zeigten 2 einen entsprechend hohen ASH-Titer.

Einen positiven Rheuma-Faktor erbrachte die Latexagglutination bei insgesamt 22 Patienten. In 5 Seren der 14 Patienten mit positivem Autoantikörperbefund ließ sich der R-F nachweisen.

Der Lupus Erythematoses-Faktor war bei 5 von insgesamt 136 Patienten positiv. 4 mal konnte bei den 14 Patienten mit lymphozytotoxischem Antikörper ein positiver (bei Serum Nr. 118 allerdings schwach) LE-F Befund erhoben werden.

Keine der untersuchten Serumproben wies einen deutlich erhöhten Kälteagglutinin-Titer auf. Die höchste Titerendstufen betrugen 1:16.

Erwähnenswert erscheint, daß der Waaler-Rose-Test zwar 16 mal und der Rheuma-Faktor 22 mal positiv gefunden wurden, daß aber nur bei 8 Patienten beide Tests ein übereinstimmend positives Ergebnis zeigten.

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob das Auftreten von lymphozytotoxischen Autoantikörpern in signifikanter Korrelation zu dem Vorhandensein positiver Ergebnisse von ASH, R-F oder LE-F steht, wurde eine statistische Auswertung der oben dargestellten Befunde durchgeführt. Es wurde nach der 4 Felder Chi-Quadrat Methode vorgegangen und der zugehörige p-Wert in einer Tabelle nachgeschlagen (97).

Diskrepante Korrelationen bestehen zu den Rheuma-

faktoren (Latextest $p < 0,05$, ASH $p > 0,7$), eine signifikante Korrelation findet sich zu den antinukleären Faktoren ($p < 0,0005$). Daß bei den untersuchten Patienten keine Korrelation zu den Kälteagglutininen besteht, wurde bereits erwähnt. Diese Ergebnisse bedürfen einiger Anmerkungen und werden später diskutiert.

3.4.0 Antikörper gegen homologe Lymphozyten:

Die gesammelten und bei -20°C aufbewahrten 136 Seren wurden auf ihren lymphozytotoxischen Effekt gegen homologe Zellen untersucht. Jedes Serum wurde dabei getrennt mit den Lymphozyten von 28 unausgewählten Spendern getestet. Die Bestimmungen wurden in 3-fach Kontrollen ausgeführt und für jede Zellart eine negative Kontrolle mit AB-Serum angelegt. Durch autologe Testung der Spender konnte sichergestellt werden, daß keiner von ihnen zytotoxische Antikörper besaß.

In Tabelle 6 ist zusammengestellt, mit wievielen Lymphozytenarten ein Serum in welcher Stärke reagierte. Auch das Ergebnis, das bei autologer Testung erhalten wurde, ist zum Vergleich wieder aufgeführt. Die Serum-Nummern entsprechen denen in Tabelle 4.

Ein Ergebnis wurde nur dann positiv gewertet, wenn die negative Kontrolle keine Zytotoxizität (maximal 9% lysierte Zellen) zeigte. Ferner ist zu berücksichtigen, daß gelegentlich unspezifisch positive Ergebnisse durch methodische Fehler auftreten können. Meist beträgt der zytotoxische Effekt solcher falsch positiv bewerteter Seren Stufe 1 der Bewertungsskala, seltener einmal Stufe 2 (also bis maximal 24% zerstörter Zellen). Unter Berücksichtigung dieser unspezifisch positiven Reaktionen soll ein Serum dann als positiv gegen homologe Lymphozyten gewertet werden, wenn es mit mehr als

2 der 28 Zellarten die Reaktionsstärke 2 erreicht oder mit zumindest einer Zellart eine stärkere Zytotoxizität aufweist.

LCT und HL-A
nach Diagnosegruppen geordnet

	LCT n	HL-A n	Gesamt n
Haematol.-onkologisch	8	19	58
Kollagenosen	3	0	6
Infektionen	1	1	12
Leber, Magen-Darm	1	5	30
Herz, Gefäße	0	2	14
Niere	0	4	9
Endokrinologisch	0	2	6
Intoxikation	1	0	1
gesamt	14	33	136

Abb. 5: Lymphozytotoxische Autoantikörper (LCT) und HL-A Antikörper nach Diagnosegruppen geordnet.

Betrachtet man diejenigen Seren in Tabelle 6, die bei autologer Testung keine zytotoxische Aktivität zeigten, so finden sich darunter 33 Seren, die nach den oben angeführten Kriterien lymphozytotoxische Antikörper gegen homologe Zellen besitzen. Das Auftreten von Anti-

körpern gegen homologe Lymphozyten ist somit bei den untersuchten Patienten ein relativ häufiges Ereignis. Es handelt sich hierbei um Antikörper, die gegen auf der Lymphozytenoberfläche vorhandene HL-A Antigene gerichtet sind. Ihre Existenz ist Zeichen einer stattgehabten Sensibilisierung mit HL-A Antigenen. Mit wievielen Zellarten das Serum eines sensibilisierten Patienten dann mit welcher Stärke reagiert, hängt von dem Ausmaß der Sensibilisierung ab.

Zwei Faktoren spielen dabei eine Rolle. Zum einen ist die Anzahl der HL-A Antigene, gegen die sensibilisiert wurde, sowie ihre Häufigkeit von Bedeutung, d.h. ob es sich um ein seltenes oder ein oftmals auftretendes Antigen handelt. Zum anderen hängt die Antikörperbildung von der Stärke des entsprechenden Antigens ab.

In Tabelle 6 können die Seren, welche nur bei homologer Testung einen zytotoxischen Effekt zeigten, grob nach ihrem Reaktionsmuster in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe reagiert nur mit wenigen Zellarten positiv, die andere hingegen mit fast allen oder allen Lymphozyten. Ein Beispiel für die erste Gruppe ist Serum Nr. 76, für die zweite Gruppe Serum Nr. 13. Die Trennung ist jedoch nicht scharf, es kommen Übergänge vor.

Patienten, deren Serum nur mit wenigen Zellarten reagieren, sind entweder nur mit einem oder zumindest wenigen HL-A Antigenen sensibilisiert worden. Das kann der Fall sein z.B. nach einer Geburt oder wenigen Bluttransfusionen. Sensibilisierung gegen mehrere schwache oder seltene Antigene ist dabei allerdings nicht auszuschließen.

Hingegen sind die Patienten, deren Serum mit nahezu allen Lymphozytenarten reagieren, zumeist gegen eine größere Anzahl HL-A Antigene sensibilisiert. Bei Poly-

transfundierten und Multipara ist dies häufig zu beobachten. Denkbar ist aber auch, daß Sensibilisierung gegen ein ubiquitär vorkommendes starkes Antigen vorliegt.

Die Seren der 14 Patienten mit zytotoxischen Antikörpern gegen autologe Lymphozyten zeigen bei Testung mit homologen Zellen ein anderes charakteristisches Verhalten. Diese Seren reagierten, wie aus Tabelle 6 ersichtlich, mit einem großen Prozentsatz homologer Lymphozytenarten in gleicher oder wenig abweichender Stärke analog den Ergebnissen mit autologen Zellen. Ein augenfälliges Beispiel ist Serum Nr. 122, das mit allen 28 Lymphozytenarten gleichartig mit Stärke 5 reagierte. Auf die Konstanz des lymphozytotoxischen Effekts auch bei Testung mit homologen Zellen wird in der Diskussion eingegangen.

Eine interessante Besonderheit ist bei Serum Nr. 14 zu beobachten. Obwohl die Reaktionsstärke bei autologer Testung nur 2 betrug, wurde mit homologen Zellen 8 mal Stufe 4 und 2 mal Stufe 5 bestimmt. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich so zu interpretieren, daß bei diesem Patienten neben dem Autoantikörper auch Antikörper gegen HL-A Antigene vorhanden sind als Ausdruck einer vorangegangenen Sensibilisierung.

2.5.0 Beeinflussung der MLC Reaktion durch lymphozytotoxische Antikörper:

Alle Seren wurden auf ihre Beeinflussung der MLC-Reaktivität nach der unter 2.2. angegebenen Methode untersucht. Die Bestimmungen wurden in 2 Versuchsserien mit unterschiedlichen Lymphozyten-Spender-Paaren der Blutgruppe O Rhesus positiv ausgeführt. Jedes Serum wurde in 6-fach Kontrollen getestet. Auf jeder

Testplatte konnten neben dem Standardansatz 11 Seren untersucht werden. Ein Versuch wurde nur dann gewertet, wenn sich anhand des Standardansatzes im Spenderplasma keine inhibitorische Aktivität nachweisen ließ.

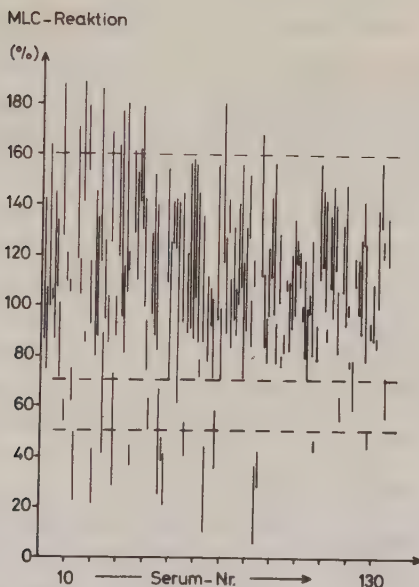


Abb. 6: Einfluß der Seren von Patienten mit Leukopenie auf die MLC Reaktion.

Um den **Effekt** des Patientenserums auf die MLC Reaktion beurteilen zu können, wurden die Testergebnisse auf die unbeeinflusste Reaktion bezogen. Als Bezugssystem diente ein Ansatz mit vorgetestetem AB-Serum, das

sich der MLC Reaktion gegenüber indifferent verhält, d.h. keinen inhibitorischen oder stimulatorischen Effekt ausübt. Für die Testung der 136 Patientenseren mußten pro Versuchsserie 13 Testplatten verwendet werden (3 je Einzelversuch bei Blutentnahme von 60 ml pro Lymphozytenspender). Da die Einstellung der Zellzahl für die Lymphozytensuspension nach dem Zählkammerverfahren erfolgte, traten methodisch bedingte Differenzen der Thymidin-Einbaurrate zwischen den verschiedenen Testplatten auf. Um den Einfluß der Seren untereinander vergleichbar zu machen, wurden die Ergebnisse nicht in Cpm (counts per minute) sondern in Relativprozent, bezogen auf die unbeeinflusste Reaktion (A und B Zellen und AB-Serum), ausgedrückt.

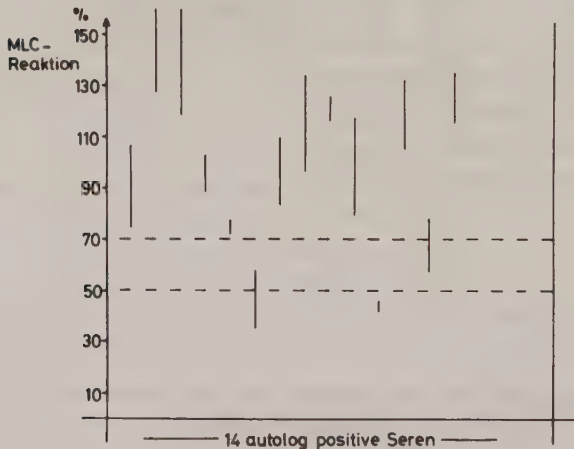


Abb. 7: Beeinflussung der MLC Reaktion durch die 14 autolog positiven Seren.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen. Von den 6 Werten in Cpm je Serumprobe wurden zunächst der höchste und der niedrigste eliminiert und dann der Mittelwert aus den 4 verbleibenden Werten berechnet. Die Reaktionsstärke der unbeeinflussten MLC Reaktion wurde gleich 100% gesetzt. Die Ergebnisse der einzelnen Patientenseren wurden auf diesen Wert bezogen und in relativen Prozent angegeben. In Tabelle 6 sind die so erhaltenen Ergebnisse für beide Versuchsserien unter der Rubrik MLC aufgeführt.

Bei etlichen Seren ist ein inhibitorischer Einfluß deutlich erkennbar. Um zu entscheiden, von welcher Reaktionsstärke abwärts man eine Inhibition annehmen sollte, wurden die Werte aller Seren in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Aus dieser Abbildung ist zu entnehmen, daß die größte Anzahl der Seren in einer Reaktionszone zwischen 70% und 160% liegt. Zwischen 70% und 50% finden sich nur wenige Ergebnisse. Unterhalb der 50% Marke treten dann wieder gehäuft Testergebnisse auf. Dieses Verteilungsmuster läßt es berechtigt erscheinen, die MLC Befunde in 3 Gruppen zu unterteilen:

1. Normalbereich: 70% - 160%
2. Fragliche Inhibition: 50% - 70%
3. Inhibition: 0% - 50%

Es soll noch auf eine Erscheinung aufmerksam gemacht werden, die die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Bei etlichen Seren traten zwischen erster und zweiter Versuchsserie größere Differenzen in der Reaktionsstärke auf. Die Länge der senkrechten Linien in Abbildung 6 ist ein direktes Maß dieser Ergebnisdivergenz. Die Zuordnung zu den 3 Gruppen soll nun so erfolgen, daß jeweils der höhere der beiden bestimmten

Werte für das entsprechende Serum die Gruppenzugehörigkeit bestimmt. Das heißt, daß eine Inhibition der MLC Reaktivität nur dann angenommen wird, wenn die Ergebnisse beider Versuchsserien weniger als 50% betragen. Unter Anwendung dieser Kriterien fanden sich 9 Seren mit inhibitorischem Effekt auf die MLC. Fraglich inhibitorisch wirkten die Seren von 6 Patienten.

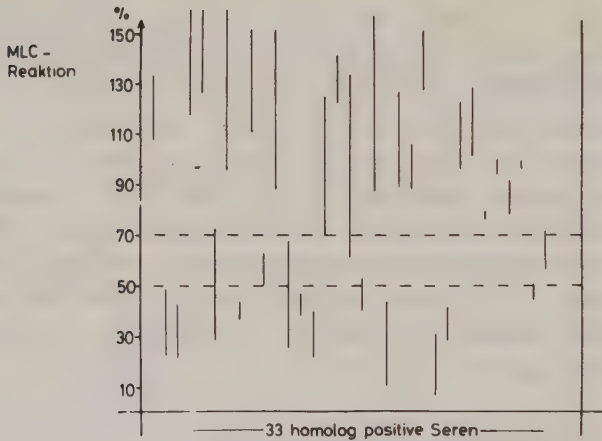


Abb. 8: Beeinflussung der MLC Reaktion durch die 33 homolog positiven Seren.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse in gleicher Weise wie in Abbildung 6 jedoch ausschließlich für die 14 Patienten eingezeichnet, welche einen positiven Antikörperbefund gegen autologe Lymphozyten zeigten. Abbildung 8 gibt das entsprechende Bild für die 33 Pa-

tienten wider, bei denen Antikörper gegen homologe Lymphozyten nachgewiesen werden konnten.

Zur statistischen Auswertung der MLC Ergebnisse wurden 3 Patientengruppen gebildet, um zu prüfen, ob Unterschiede in der Inhibition der MLC Reaktion nachweisbar sind.

Gruppe A = Seren der Patienten ohne Antikörper.

Gruppe B = Seren der Patienten mit Autoantikörpern.

Gruppe C = Seren der Patienten mit HL-A Antikörpern.

Da die Inhibitionsversuche in der MLC mit 2 unterschiedlichen Paaren von Lymphozyten vorgenommen wurden, wurde zunächst geprüft, ob die beiden voneinander unabhängigen Serien zu einer gleichen Aussage kommen.

Bei $n = 136$ ist $a = 7,03$ und $r = 0,743$ und damit $p < 0,001$, wenn von den Mittelwerten $\bar{x}_1$ 118,562 und $\bar{x}_2$ 89,423 ausgegangen wird.

In der Gruppe mit lymphozytotoxischen Autoantikörpern findet sich nur ein Serum, welches inhibitorisch wirkt, während in der Gruppe mit den HL-A Antikörpern 8 Seren inhibitorisch wirken. Rechnet man mit den Mittelwerten der einzelnen Gruppen, so unterscheidet sich Gruppe A nicht signifikant von Gruppe B. Gleichfalls besteht kein signifikanter Unterschied zwischen B und C.

Eine deutliche Signifikanz findet sich jedoch zwischen der Gruppe A und der Gruppe C (A_1 zu C_1 und A_2 zu C_2). Diese ist mit $p < 0,005$ signifikant (21,97).

Tabelle 7 enthält eine Zusammenstellung der Mittelwerte, der Standardabweichungen und der Vertrauenskoeffizienten in den einzelnen gebildeten Gruppen. Die Abbildung 9 zeigt den Einfluß der Seren von Patienten mit Leukopenie auf die MLC Reaktion. 1 und 2 repräsentieren die beiden unterschiedlichen Lymphozytenpaare. Die Einbaurate in Gegenwart eines ausgetesteten AB-Serum-Pools wurde gleich 100% gesetzt.

A = keine Antikörper, B = lymphozytotoxische Autoantikörper, C = Antikörper gegen Transplantationsantigene. Aufgetragen sind die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s).

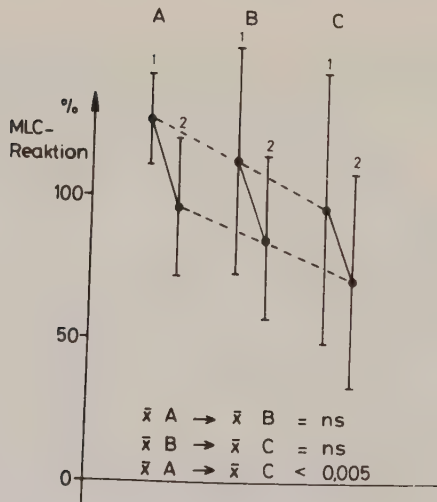


Abb. 9: Erläuterungen siehe Text.

4. DISKUSSION.

4.1.0 Methode Microcytotoxizitätstest:

Der Microcytotoxizitätstest wurde in die Transplantationsimmunologie zur Bestimmung von Histocompatibilitätsantigenen eingeführt (59,77,105). Später ließen sich mit Hilfe dieses Tests auch Antikörper gegen Lymphozyten nachweisen, die keine HL-A Spezifität besitzen. Diese Antikörper reagieren auch mit autologen Zellen und wurden deshalb als Autoantikörper aufgefasst. Sie können bei verschiedenartigen Erkrankungen auftreten (62,78,79,85,102,106).

Die Abgrenzung beider Antikörperarten war anfangs deshalb so schwierig, da für deren Nachweis ein und dasselbe Testsystem (Microcytotoxizitätstest) und das gleiche Substrat (homologe Lymphozyten) benutzt wurden. Von verschiedenen Autoren konnte gezeigt werden, daß Autoantikörper im Microcytotoxizitätstest eine andere Spezifität besitzen als HL-A Antikörper. Als Unterscheidungsmerkmale dienten dabei das Temperaturoptimum und die Inkubationsdauer der lymphozytotoxischen in vitro Reaktion (78,79,106). Da in der Literatur divergierende Angaben über das diesbezügliche Verhalten des Lymphozyten-Autoantikörpers vorliegen, erschien es notwendig, in eigenen Untersuchungen experimentell die Kriterien genau festzulegen, die eine Unterscheidung von HL-A Antikörpern erlauben.

Dabei wurden zur Ausführung des Microcytotoxizitätstests die nach Klingelhöfer und Malchow modifizierte Kissmeyer-Nielsen Technik (60,61) und die von Mittal et al. angegebene Methode verwendet (77). Beide Methoden sind Zwei-Phasen-Tests, d.h. Komplement wird erst nach Vorinkubation des Lymphozyten-Serum-Gemischs

zugegeben. Mittal et al. wiesen nach, daß dadurch die Empfindlichkeit des Tests erheblich gesteigert werden kann (77).

Im direkten Vergleich beider Methoden fanden wir bei gleichen Inkubationsbedingungen, daß die Mittal-Methode geringfügig empfindlicher als die nach Kissmeyer-Nielsen ist. Die höhere Sensibilität ist möglicherweise auf den größeren Komplementanteil bei der Technik nach Mittal zurückzuführen und veranlasste uns, die Pestserien mit den Patientenseren nur nach dieser Methode auszuführen.

Die zum Nachweis des lymphozytotoxischen Autoantikörpers optimale Inkubationsdauer und -temperatur im Microcytotoxizitätstest wurde von etlichen Autoren untersucht. Mottironi und Terasaki fanden maximale Reaktionsstärke bei Inkubationsdauer von 3 Stunden bei 15°C nach 30-minütiger Vorinkubation bei Zimmertemperatur (79,106). Diese Testbedingungen wurden durch die Arbeiten von Michlmayer et al. (74), Klingelhöfer et al. (60,61), Ooi et al. (85) bestätigt und stehen in Einklang zu unseren Ergebnissen.

Mittal et al. fanden demgegenüber die höchste Rate positiver Ergebnisse bei einer Inkubationstemperatur von 22°C bei einstündiger Inkubationsdauer (78).

Stastny und Ziff testeten bei 5°, 22° und 37°C, sie geben die optimale Reaktionstemperatur bei 37°C nach Inkubationsdauer von 1 Stunde an, bei 5°C konnten sie keinerlei Zytotoxizität mehr nachweisen (102).

Nach unseren Erfahrungen ist die Methode bei Beachtung schonender Lymphozytenpräparation und pH-Kontrolle von Eosin- und Formalin-Lösung leicht zu handhaben und ergibt gut reproduzierbare Ergebnisse.

4.2.0 Charakterisierung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers und Abgrenzung gegenüber HL-A Antikörpern:

Lymphozytotoxische Autoantikörper zeichnen sich im Microcytotoxizitätstest dadurch aus, daß sie nach 30 Minuten Vorinkubation bei Zimmertemperatur ein Reaktionsoptimum bei einer Inkubationstemperatur von 15°C und einer Inkubationsdauer von 3 Stunden besitzen. Damit unterscheiden sie sich deutlich von HL-A Antikörpern, deren stärkste lymphozytotoxische Potenz nach einstündiger Vorinkubation bei Zimmertemperatur bei einer Inkubationstemperatur zwischen 22°C und 37°C und einer Inkubationsdauer von $1/2 - 1$ Stunde erreicht ist (59,77).

Ein Hauptkriterium des Autoantikörpers ist seine Reaktion mit autologen Lymphozyten. Hierin läßt er sich am sichersten von HL-A Antikörpern abgrenzen, die ausschließlich mit homologen Lymphozyten nach stattgehabter Sensibilisierung gegen HL-A Eigenschaften reagieren. Aus diesem Grunde wurden in unseren Versuchen alle Patientenserum gegen autologe Lymphozyten getestet.

Die Affinität des Autoantikörpers zur Lymphozytenmembran scheint sehr groß zu sein. Stastny und Ziff beschrieben als erste, daß Lymphozyten von Patienten, welche solche Autoantikörper im Serum aufwiesen, allein bei Inkubation mit Komplement lysiert werden (103). Diesen Effekt konnten auch wir bei der -als Negativkontrolle angelegten- Testung von autologen Lymphozyten mit Komplement und AB-Serum beobachten. Da es sich bei dem verwendeten AB-Serum um ein vorgetestetes Serum handelte, das keine lymphozytotoxische Aktivität besaß, ist dieser Effekt nur so zu erklären, daß der Autoantikörper derart fest an die Lymphozyten-

membran gebunden ist, daß er bei der Präparation der Zellen weiter haften bleibt und dann in Gegenwart von Komplement die Zellmembran lysiert.

Ein weiteres Charakteristikum des lymphozytotoxischen Autoantikörpers ist die Konstanz des zytotoxischen Effekts bei Testung mit homologen Zellen. Darunter ist die Tatsache zu verstehen, daß Seren mit positivem Autoantikörper-Befund mit einer Vielzahl homologer Lymphozyten in gleicher oder zumindest wenig abweichender Stärke analog zu den Ergebnissen mit den autologen Zellen reagieren. Auch in diesem Verhalten kommt die große Affinität des Autoantikörpers zur Lymphozytenmembran zum Ausdruck. Zur Erklärung können zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: entweder ist die Spezifität des Antikörpers nicht sehr groß, so daß er mit verschiedenen unterschiedlichen Membranbestandteilen homologer Lymphozyten reagiert, oder er ist gegen ein ubiquitäres Antigen gerichtet, welches auf allen oder fast allen Lymphozyten vorhanden ist. Da über die antigene Determinante, gegen welche der zytotoxische Autoantikörper gerichtet ist, bislang nichts bekannt ist, kann diese Frage nicht entschieden werden.

Nun darf aus der Reaktion eines Antikörpers mit einer Vielzahl homologer Lymphozyten jedoch nicht auf das Vorliegen eines Autoantikörpers geschlossen werden. Auch HL-A Antikörper können derart reagieren. Wie unter 3.4.0 dargelegt, können HL-A Antikörper nur mit wenigen homologen Lymphozyten oder aber mit allen eine zytotoxische Reaktion zeigen. Das Reaktionsmuster hängt dabei von Art und Ausmaß der vorangegangenen Sensibilisierung ab. Von Bedeutung sind dabei die Anzahl der HL-A Antigene, gegen welche sensibilisiert wurde, ihre Häufigkeit in Bezug auf ihr Vorkommen und schließlich die Stärke des Antigens.

Außerdem ist zu bedenken, daß sehr wohl Autoantikörper und Antikörper gegen HL-A Antigene bei dem selben Individuum vorhanden sein können. Bei einem Serum in unserer Versuchsreihe lag wahrscheinlich ein solcher Fall vor (Serum Nr. 14).

Auch in ihrer Zugehörigkeit zu den Immunglobulin-klassen unterscheiden sich beide Antikörperarten. HL-A Antikörper gehören nach den Untersuchungen von Anrons und Glavind-Kristensen ganz überwiegend zu den IgG-Globulinen, IgM-Antikörper wurden nur vereinzelt nachgewiesen (2). Demgegenüber handelt es sich bei dem lymphozytotoxischen Autoantikörper fast ausschließlich um IgM-Globuline (68,74).

Lies et al. konnten anhand 23 Seren von Patienten mit LE und positivem Antikörperbefund eine relative T-Zell Spezifität des lymphozytotoxischen Autoantikörpers zeigen (63). HL-A Antikörper reagieren mit B- und T-Lymphozyten gleich stark. Da diese Ergebnisse nur mit Seren von Patienten mit LE gewonnen wurden, muß zunächst weiter überprüft werden, ob der Autoantikörper generell vorwiegend gegen T-Zellen gerichtet ist. Deshalb möchten wir diese Befunde zunächst mit Zurückhaltung werten.

Zusammenfassend kann man den Autoantikörper durch folgende Eigenschaften charakterisieren:

1. Reaktion mit autologen Zellen.
2. Reaktion in vitro bei einer Inkubationstemperatur von 15°C.
3. Konstanz des zytotoxischen Effekts bei Testung mit homologen Lymphozyten.
4. Überwiegende Zugehörigkeit zur IgM-Globulin-klasse.
5. Hohe Affinität zur Lymphozytenmembran bei geringer Spezifität.

4.3.0 Lymphozytotoxische Autoantikörper und Erkrankung:

Antikörper gegen autologe Lymphozyten sind bisher vorwiegend bei Autoimmunerkrankungen beobachtet worden. Besonders intensiv sind Patienten mit Lupus erythematoses visceralis auf das Vorhandensein solcher Antikörper untersucht worden.

Mittal et al. fanden bei Testung mit homologen Lymphozyten einen positiven Antikörper-Befund bei 74% aller Seren von Patienten mit LE (78). 56 von 64 Seren von LE-Patienten wiesen bei den Untersuchungen von Terasaki et al. lymphozytotoxische Autoantikörper auf (106). Stastny und Ziff geben die Rate positiver Befunde sowohl mit homologen als auch mit autologen Zellen mit 60% an (102). Demgegenüber fand J. F. Shaw bei homologer Festung nur bei 25% aller Seren von Patienten mit LE Autoantikörper (100). Michlmayer et al. testeten die Seren von 12 LE-Patienten gegen autologe Zellen, 11 Patienten hatten Autoantikörper (74). Bei homologer Testung geben Ooi und Mitarbeiter 88% positive Ergebnisse an (85). Klingelhöfer und Malchow konnten bei 3 von 10 Patienten mit LE Autoantikörper nachweisen (61), in einer weiteren Arbeit von Malchow et al. reagierten 15 von 27 Patienten mit LE positiv gegen Lymphozyten (70).

In dem von uns untersuchten Krankengut von Patienten mit Leukopenie befanden sich 3 Patienten mit visceralem Erythematodes, bei allen ließen sich lymphozytotoxische Autoantikörper nachweisen.

Auch bei den anderen Kollagenosen, bei der Pcp (61,70, 78,106), bei der progressiven Sklerodermie (61,70) und bei der Dermatomyositis (70) wurden Antikörper gegen Lymphozyten beschrieben. Aus dieser Diagnosegruppe befand sich jedoch kein Patient in unserem Untersuchungsgut.

Die größte Häufung positiver Befunde fanden wir bei den hämatologisch-onkologischen Systemerkrankungen (siehe Tabelle 5). Daß es in dieser Gruppe von Erkrankungen häufig zu einer Antikörperbildung gegen autologe Lymphozyten kommt, wurde bereits von Malchow et al. und von Grifoni et al. gefunden (70,49). Der Nachweis von Autoantikörpern wurde dabei als Ausdruck eines gestörten Immunsystems bei diesen Erkrankungen angesehen.

Weiter wurde bei unseren Untersuchungen je ein positiver Autoantikörper-Befund bei einer infektiösen Mononukleose, bei einer Leberzirrhose bei chronischer Hepatitis und bei einer Intoxikation beobachtet. Eine besondere Häufung lymphozytotoxischer Antikörper bei Viruserkrankungen wurde erstmals von Mottironi und Terasaki beschrieben. Nach diesen Befunden ist insbesondere bei der infektiösen Mononukleose, bei Röteln und bei Masern mit dem Auftreten von Autoantikörpern zu rechnen (79).

Besonderes Interesse verwendeten verschiedene Untersucher auf die Frage, ob sich aus dem Nachweis lymphozytotoxischer Autoantikörper Hinweise auf die Aktivität der Erkrankung und eventuell auf einen Therapieerfolg ergeben. Diese Überlegungen wurden besonders für den systemischen LE überprüft. Stastny und Ziff fanden, daß bei Patienten mit LE, bei denen anfangs Antikörper nachgewiesen werden konnten, nach Steroid-Therapie keine lymphozytotoxischen Autoantikörper mehr nachweisbar waren (102). Eine Beziehung zwischen dem Auftreten zirkulierender Antikörper gegen Lymphozyten und der Schwere des Krankheitsbildes beim LE mit Fieber, Hautzeichen, zentralnervösen Manifestationen und hämatologischen Symptomen konnten Butler et al. aufzeigen (20). Malchow und Mitarbeiter teilten den Fall eines Mannes mit PcP mit, der 10 Jahre lang mit

Steroiden behandelt wurde und bei dem keine Antikörper nachgewiesen werden konnten; nach Absetzen der Prednison-Therapie wurde die lymphozytotoxische Reaktion stark positiv (69).

Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint es durchaus möglich, daß eine Beziehung zwischen der lymphozytotoxischen Aktivität einerseits und der Ausprägung der Erkrankung und der erfolgreichen Therapie andererseits besteht.

4.4.0 Lymphozytotoxische Autoantikörper und serologische Parameter:

Mit dieser Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob bei Patienten mit Leukopenie lymphozytotoxische Antikörper gegen autologe Zellen gehäuft nachgewiesen werden können. Damit ist auch die Frage verbunden, ob eine Leukopenie in vivo durch solche Autoantikörper verursacht sein kann.

Von 136 untersuchten Patienten mit Leukopenie wiesen 14 Antikörper gegen autologe Lymphozyten auf, das entspricht ca. 10% positiver Befunde.

In einem unausgewählten Krankengut fanden Malchow und Mitarbeiter bei 128 von 1324 Patienten lymphozytotoxische Antikörper gegen homologe Lymphozyten (70). In einer weiteren Studie wurden die Seren mit lymphozytotoxischer Aktivität gegen autologe Zellen getestet (69). 72 mal konnte die mit homologen Zellen positive Reaktion an autologen Zellen überprüft werden, von diesen zeigten 42 eine positive Reaktion mit autologen Lymphozyten.

Der Nachweis von lymphozytotoxischen Autoantikörpern in 10% bei Patienten mit Leukopenie ist somit rechnerisch etwa doppelt so hoch wie in einem unausgewählten

Patientenkollektiv. Es konnte bei unseren Untersuchungen jedoch in keinem Fall wahrscheinlich gemacht werden, daß Autoantikörper gegen Lymphozyten zur Leukopenie beitragen. Wir nehmen deshalb an, daß eine durch lymphozytotoxische Autoantikörper bedingte Leukopenie ebenso selten ist wie eine Neutropenie durch den kürzlich beschriebenen anti-NA 2-Antikörper (42).

Da lymphozytotoxische Antikörper anfangs ganz überwiegend beim LE gefunden wurden, wurde immer wieder die Frage nach der Beziehung zwischen diesem Antikörper und den antinukleären Faktoren gestellt.

Terasaki et al. berichteten als erste über eine deutliche Korrelation des lymphozytotoxischen Antikörpers zum ANF (106). Butler und Mitarbeiter beurteilten die Beziehung zwischen ANF und Antikörpern gegen Lymphozyten eher zurückhaltend, da sie zeigen konnten, daß wechselnde lymphozytotoxische Aktivität nicht mit entsprechendem Verhalten der ANF einhergehen muß (20).

Malchow et al. fanden eine auf dem 5%-Niveau signifikante Korrelation von antinukleären Faktoren und positivem Antikörperbefund mit autologen Zellen in einem unausgewähltem Patientengut (69).

Unsere Ergebnisse erbrachten eine hochsignifikante Korrelation ($p < 0,0005$) der lymphozytotoxischen Autoantikörper zu den antinukleären Faktoren. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, daß unser Patientengut ausgewählt war und die Gruppe der Patienten mit LE, bei der mit einem positiven Antikörperbefund und einem positiven ANF-Nachweis zu rechnen ist, überdurchschnittlich stark repräsentiert war.

Da das Vorkommen lymphozytotoxischer Autoantikörper als Ausdruck einer gestörten Immunitätslage angesehen werden kann, ist die Beziehung dieses Antikörpers zu anderen serologischen Parametern von Interesse, die bei Autoimmunerkrankungen auftreten insbesondere zu

den Rheuma-Faktoren.

In unserem Krankengut fanden wir diskrepante Korrelationen zu dem Waaler-Rose-Test (ASH) und dem RF-Latextest. Keine Beziehung besteht zu dem Waaler-Rose-Test ($p > 0,7$), eine signifikante Korrelation auf dem 5%-Niveau findet sich für den RF-Latextest ($p < 0,05$). Eine statistisch signifikante Korrelation des Antikörpers gegen Lymphozyten zum Nachweis des Rheumafaktors mit der Latexagglutination konnten auch Malchow und Mitarbeiter zeigen (69).

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig. Da für das Zustandekommen eines positiven Rheumafaktors und dem Auftreten lymphozytotoxischer Antikörper kaum das gleiche ursächliche Prinzip beweisbar ist, möchten wir beide Autoimmunphänomene als Ausdruck einer eingeschränkten oder gestörten immunologischen Aktivität ansehen.

Schließlich sei noch auf die Beziehung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers zu den Kälteagglutininen eingegangen. Da die optimale Inkubationstemperatur des Antikörpers gegen autologe Lymphozyten in vitro bei 15°C liegt, und Kälteagglutinine auch zytotoxisch (nämlich auf Erythrozyten) wirken können, wurde an eine Korrelation beider Antikörper gedacht. In unserem Untersuchungsgut konnten wir jedoch bei keinem Patienten einen erhöhten Kälteagglutinin-Titer feststellen. Wir sind daher der Auffassung, daß keine Beziehung zwischen dem lymphozytotoxischen Autoantikörper und den Kälteagglutininen besteht.

4.5.0 Beeinflussung der MLC durch lymphozytotoxische Antikörper:

Die Seren der Patienten mit Leukopenie wurden auf

ihren Einfluß in der MLC mit jeweils zwei unabhängigen Lymphozytenpaaren untersucht. Beide Untersuchungsreihen waren gut miteinander vergleichbar. Insgesamt fanden sich 9 Seren, die nach unseren strengen Kriterien eine Inhibition der MLC-Reaktion verursachten. Davon gehörte nur ein Serum der Gruppe der Patienten mit lymphozytotoxischen Autoantikörpern an, während in der Gruppe der Patienten mit HL-A Antikörpern 8 Seren inhibitorisch wirkten.

Diese Beobachtungen stehen in Einklang zu einer Reihe von Untersuchungen, bei denen gezeigt werden konnte, daß Antiseren, welche HL-A Antikörper enthalten, sowohl die stimulierenden als auch die antwortenden Zellen in der MLC hemmen können (17,22,50,94).

Thorsby und Mitarbeiter stellten nach neueren Untersuchungen die Hypothese auf, daß durch die Bindung des HL-A Antikörpers an die Lymphozytenmembran eine sterische Behinderung oder eine direkte Inaktivierung von Rezeptoren auftritt und die für die Stimulierung in der MLC notwendigen Rezeptoren nicht zur Wirkung gelangen können (107).

Überraschend ist das Ergebnis, daß wir nur bei einem Serum mit positivem Antikörperbefund gegen autologe Zellen eine deutliche Inhibition der MLC nachweisen konnten. Malchow und Mitarbeiter fanden eine überwiegend inhibierende Wirkung lymphozytotoxischer Seren sowohl auf die unspezifische (PHA) als auch auf die spezifische Stimulation in der MLC (68).

Auch Williams et al. konnten eine deutliche Korrelation des supprimierenden Effekts auf die MLC zu dem Vorhandensein zytotoxischer Antikörper gegen Lymphozyten (bei homologer Testung) nachweisen (119). Allerdings fand sich die stärkste inhibitorische Aktivität in der IgG-Serumfraktion; für lymphozytotoxische Autoantikörper ist hingegen die Zugehörigkeit zur IgM-Globu-

linklasse typisch.

Es muß die Frage gestellt werden, ob für die Inhibition der MLC wirklich der lymphozytotoxische Autoantikörper verantwortlich ist oder ein anderer Serumfaktor, der bei verschiedenen, vorwiegend autoimmunologisch bedingten, Erkrankungen auftritt.

So ist eine Suppression der MLC-Antwort bei verschiedenen Erkrankungen beobachtet worden, ohne daß das Vorhandensein lymphozytotoxischer Antikörper untersucht wurde. Eine Inhibition der MLC wurde bislang beschrieben beim systemischen LE (29,115,119), bei der rheumatoiden Arthritis (54,119), beim akuten rheumatischen Fieber (64) und bei intrakraniellen Tumoren (16).

Die Inhibition der MLC beruht wahrscheinlich weniger auf einem direkten zytotoxischen Einfluß sondern auf einer Maskierung von Antigenen, die für die MLC-Aktivierung notwendig sind, durch noch nicht näher bekannte blockierende Antikörper (67,115). Der Mechanismus der MLC-Suppression scheint dabei ganz ähnlich wie bei der Blockierung durch HL-A Antikörper zu sein. Wernet und Kunkel konnten zeigen, daß in Seren von Patienten mit LE Antikörper gegen Membranbestandteile von T-Lymphozyten mit niedrigem Molekulargewicht aufweisen, die in der Lage sind, die MLC zu inhibieren (116). Ob es sich hierbei um das gleiche Antigen handelt, gegen welches auch der lymphozytotoxische Autoantikörper gerichtet ist, bleibt jedoch weiterhin offen.

Durch unsere Untersuchungen kann nicht beantwortet werden, ob eine biologische Bedeutung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers darin liegt, daß er die Proliferation der Lymphozyten in der Lymphozytenmischkultur beeinflusst. Wegen der kleinen Zahl -es waren nur 14 Seren mit lymphozytotoxischen Autoantikörpern bei den Patienten mit Leukopenie- und der großen Streu-

ung der Einzelwerte konnte ein signifikanter Unterschied zu der Patientengruppe ohne Antikörper nicht errechnet werden. Gesichert erscheint jedoch, daß Antikörper gegen HL-A Eigenschaften eine Inhibition der MLC-Reaktion bedingen können.

4.6.0 Zur biologischen Bedeutung lymphozytotoxischer Autoantikörper; Hypothesen:

Die Vermutung, daß die bei verschiedenen Autoimmun-erkrankungen insbesondere aber beim LE immer wieder zu beobachtende Leukopenie durch Autoantikörper bedingt sein könnte, führte zum Nachweis eines lymphozytotoxischen Antikörpers gegen autologe Zellen.

Dieser Autoantikörper scheint nach den Adsorptionsversuchen von Malchow et al. (68) und den Untersuchungen von Michlmayer et al. (74) relativ spezifisch gegen Lymphozyten gerichtet zu sein. Er läßt sich von HL-A Antikörpern eindeutig abgrenzen.

Über das Antigen, gegen welches der Autoantikörper gerichtet ist, ist kaum etwas bekannt. Aus der Tatsache, daß der Autoantikörper mit einer Vielzahl homologer Lymphozyten reagiert, was wir als Konstanz des zytotoxischen Effekts bezeichnet haben, läßt sich folgern, daß das entsprechende Antigen auf der Lymphozytenmembran von gesunden Personen vorhanden und weit verbreitet ist.

Daß durch die Wirkung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers in vivo eine deutliche Lymphopenie entstehen kann, halten wir nach unseren Beobachtungen eher für unwahrscheinlich.

Von vielen Autoren wurde immer wieder auf die enge Korrelation des lymphozytotoxischen Autoantikörpers zu den antinukleären Faktoren hingewiesen (69,85,106).

Auch wir konnten diesen Befund bestätigen. Von Butler und Mitarbeitern wurde vermutet, daß eine Bedeutung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers darin liegt, daß er die Lymphozytenmembran in Gegenwart von Komplement durchlässig macht und zur Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen führt, welche die Antikörperbildung gegen nukleäre Antigene stimulieren (20).

Eine schwer zu entscheidende Frage bezieht sich auf die Homogenität der lymphozytotoxischen Autoantikörper, d.h. ob es sich bei dem Nachweis des Autoantikörpers bei verschiedenen Erkrankungen immer um den gleichen Antikörper handelt oder ob vielleicht mehrere Arten von Antikörpern vorliegen, die aber alle zytotoxisch auf autologe Lymphozyten wirken.

Uns erscheinen Zweifel an der Homogenität der Antikörpergruppe berechtigt. Geht man nämlich von der Voraussetzung aus, daß lymphozytotoxische Autoantikörper "normalerweise" vorwiegend bei hämatologisch-onkologischen Erkrankungen zumindest aber bei Patienten mit gestörtem Immunsystem beobachtet werden, so ist es überraschend, wenn man diese Antikörper auch bei der infektiösen Mononukleose antrifft, einer Erkrankung mit Epstein-Barr-Virus, die ganz überwiegend junge (und sonst gesunde) Patienten betrifft.

Das Vorkommen lymphozytotoxischer Autoantikörper bei Patienten mit infektiöser Mononukleose scheint im Gegensatz zum Nachweis solcher Antikörper bei anderen Erkrankungen ein relativ häufiges Ereignis zu sein. Nach eigenen unveröffentlichten Untersuchungen fanden wir bei 4 von 5 untersuchten Patienten dieser Diagnose zytotoxische Antikörper gegen autologe Lymphozyten.

Bestärkt wird die Vermutung, daß es sich hierbei um einen abgrenzbaren anderen lymphozytotoxischen Autoantikörper handelt, durch die Untersuchungen von

Malchow und Mitarbeitern. Diese konnten zeigen, daß der Autoantikörper, der bei Erkrankungen mit gestörtem Immunsystem auftritt, der IgM-Klasse angehört, der bei der infektiösen Mononukleose nachweisbare Autoantikörper aber der IgG-Globulinklasse (68).

Für die Entstehung lymphozytotoxischer Autoantikörper bei Viruserkrankungen bieten Terasaki et al. eine interessante Hypothese zur Erklärung an (106): Viren könnten Zellmembranen derart verändern, daß Lymphozyten Antikörper gegen diese alterierten Strukturen bilden. Diese Antikörper könnten aber kreuzreagieren mit Antigenen, die auf der Lymphozytenmembran vorhanden sind.

Als gesichert darf angesehen werden, daß eine Beziehung zwischen eingeschränkter immunologischer Funktion und lymphozytotoxischen Autoantikörpern besteht (70). Auch in unseren Ergebnissen ist die Häufung positiver Befunde bei den Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen deutlich. Damit ist der Nachweis lymphozytotoxischer Autoantikörper nicht für eine bestimmte Diagnose charakteristisch sondern gibt einen Hinweis auf eine gestörte Immunfunktion.

Wie kann es aber zur Bildung von Antikörpern gegen autologe Zellen kommen? Nach den Vorstellungen von Burnet ("clonal selection theory" und "forbidden clone hypothesis") werden in der Embryonalperiode Lymphozyten, die potentiell in der Lage sind, gegen körpereigenes Gewebe zu reagieren, eliminiert (18,19). Autoimmunerkrankungen können danach im wesentlichen durch zwei Mechanismen entstehen. Erstens können durch Mutationen von immunkompetenten Lymphozyten Zellklone (forbidden clones) entstehen, die zur Reaktion mit körpereigenem Material in der Lage wären. Zweitens sollen einige Organe durch ihre anatomische

Lage normalerweise nicht mit immunkompetenten Lymphozyten in Berührung kommen; falls es doch zu einem Kontakt kommt, kann eine Antikörperproduktion in Gang gesetzt werden.

Nach neueren Untersuchungen lassen sich diese Vorstellungen über die Entstehung von Autoimmunphänomenen nicht mehr aufrechterhalten. Wie die Arbeiten von Cohen, Feldmann und Wekerle im Tierexperiment zeigen konnten, existieren im normalen Immunsystem durchaus Lymphozyten, die potentiell in der Lage sind, gegen körpereigene Antigene eine Immunreaktion hervorzurufen (24,25,46,114). Für die natürliche Selbsttoleranz ist vielmehr ein anderer Kontrollmechanismus vorhanden, der die selbstreaktiven Lymphozyten an einem Aktivwerden hindert. Dieses Kontrollsystem besteht nach den oben genannten Autoren darin, daß Gewebsantigene in tolerogener Form ins Serum abgegeben werden und die Rezeptoren der potentiell selbstreaktiven Lymphozyten blockieren.

Nach diesem Konzept kann es nach 3 Mechanismen zu einer Autoantikörperbildung kommen:

1. Verlust der tolerogenen Eigenschaften durch Veränderung der löslichen Antigene z.B. durch Viren.
2. Änderung der Lymphozytenreaktivität durch genetische oder andere Faktoren, so daß die Selbsttoleranz nicht aufrecht erhalten werden kann.
3. Vorübergehende nicht ausreichende Konzentration von Tolerogenen.

Diese neuen Überlegungen scheinen eine vielversprechende Arbeitsgrundlage für die weitere Erforschung der Autoimmunität zu sein.

Eine Besonderheit des lymphozytotoxischen Autoantikörpers liegt darin, daß hier ein Autoantikörper vorliegt, der selbst gegen immunkompetente Zellen gerichtet ist. Einerseits ist festzustellen, daß sein

Auftreten vorwiegend bei gestörter oder eingeschränkter immunologischer Aktivität beobachtet wird, andererseits muß man aber in Betracht ziehen, daß der Autoantikörper selber auch zu dieser Einschränkung der Immunfunktion beitragen könnte.

Geht man von der Beobachtung aus, daß der lymphozytotoxische Autoantikörper die MLC-Reaktivität inhibieren kann, so erscheint es möglich, daß er auch in vivo eine Änderung der immunologischen Aktivität hervorrufen kann. Als möglicher Mechanismus für die Behinderung von Immunantworten käme ein sog. "zentrales Enhancement" in Frage, d.h. daß Lymphozyten in ihrer Reaktivität von zirkulierenden Antikörpern (bzw. Antigen-Antikörper-Komplexen) behindert werden, die sich an die Lymphozytenmembran binden und zu einer Blockierung entsprechender Rezeptoren führen. Eine derartige Interferenz von Immunreaktionen wurde erstmals 1952 von Kaliss und Molomut als Enhancement beschrieben (58) und spielt heute eine große Rolle in der Tumorummunologie (113).

Die Beziehung einer gestörten immunologischen Funktion zum Auftreten lymphozytotoxischer Autoantikörper wäre damit eine gegenseitige. Eine gestörte immunologische Aktivität könnte einerseits die Bildung von lymphozytotoxischen Autoantikörpern bedingen andererseits aber durch eben diese Antikörper verstärkt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG.

Lymphozytotoxische Antikörper gegen autologe Zellen sind bislang vorwiegend bei Autoimmunerkrankungen beobachtet worden. Sie führen in vitro zu einer komplementabhängigen Lyse sowohl homologer als auch autologer Lymphozyten, deshalb handelt es sich um einen Autoantikörper. Er gehört vermutlich der IgM-Globulinklasse an. Sein Reaktionsoptimum liegt in vitro bei 15°C.

Wir untersuchten 136 Patienten mit Leukopenie (< 4000 Leukozyten pro μl Blut) mit Hilfe einer Variation des Zwei-Phasen-Microcytotoxizitätstests auf das Vorhandensein lymphozytotoxischer Autoantikörper. 14 Patienten wiesen solche Autoantikörper auf, das entspricht ca. 10% aller untersuchter Seren. Eine Häufung positiver Befunde fanden wir bei den hämatologisch-onkologischen Erkrankungen und bei den Kollagenosen. 33 der 136 Seren zeigten einen positiven HL-A Antikörper-Nachweis. Die HL-A Antikörper waren überwiegend polyspezifisch. Auf die Abgrenzung des Autoantikörpers gegen Lymphozyten von HL-A Antikörpern wird eingegangen.

Diskrepante Korrelationen des lymphozytotoxischen Autoantikörpers bestehen zu den Rheumafaktoren (Waalser-Rose-Test $p > 0,7$, RF-Latextest $p < 0,05$). Eine signifikante Korrelation findet sich zu den antinukleären Faktoren ($p < 0,0005$). Keine Beziehung besteht zu den Kälteagglutininen.

Die Seren der Patienten mit Leukopenie wurden auf ihren Einfluß in der Lymphozytenmischkultur mit jeweils zwei unabhängigen Lymphozytenpaaren untersucht. Zur Ausführung wurde ein Microassay verwendet. Beide Untersuchungsreihen waren gut miteinander vergleichbar. Es zeigten 3 der 33 Seren mit HL-A Antikörpern und 1 von 14 Seren mit lymphozytotoxischen Autoanti-

körpern eine Inhibition der MLC Reaktion, die mehr als 50% der Einbaurate betrug.

Die biologische Bedeutung des lymphozytotoxischen Autoantikörpers liegt möglicherweise darin, daß er die Lymphozytenmembran in Gegenwart von Komplement durchlässig macht und somit z.B. beim visceralen Erythematodes die antinukleären Faktoren zur Wirkung gelangen läßt. Es konnte in keinem Fall wahrscheinlich gemacht werden, daß lymphozytotoxische Autoantikörper zur Leukopenie beitragen. Da einerseits das Auftreten des lymphozytotoxischen Autoantikörpers vorwiegend bei eingeschränkter immunologischer Aktivität beobachtet wird, andererseits dieser Antikörper selbst gegen immunkompetente Zellen gerichtet ist, wird die Interferenz von Immunreaktionen durch den Autoantikörper diskutiert.

Tabelle 1

6. TABELLEN.

Rate der zerstörten Lymphozyten

S.-Nr.	Lympho	Temp. (°C):			10			15			22			37		
		Dauer (h):			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	A	1	2	3	3				0	2	3	4				
	B	1	2	3	3				1	3	4	4		0	1	1
	C	0	2	3	3				1	2	4	4		0	1	1
2	A	0	1	2	2				0	1	1	1		0	1	1
	B	0	1	2	2				0	1	2	2		0	1	1
	C	0	1	2	2				0	1	2	2		0	1	1
3	A	0	1	2	2				0	1	3	3		0	1	1
	B	1	3	3	3				2	3	4	4		0	3	3
	C	0	2	3	3				1	2	3	3		1	1	2
4	A	0	0	1	1				0	1	2	2		0	1	1
	B	0	1	2	2				0	1	2	2		0	1	1
	C	0	0	1	1				0	1	3	3		0	1	1

Rate der zerstörten Lymphozyten

S.-Nr.	Lympho	Temp. (°C):			10			15			22			37		
		Dauer (h):			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
5	A				0	0	1	1								
	B				0	1	2	2								
	C				0	1	1	1								
neg. Kontr.	A				0	0	0	0								
	B				0	0	0	0								
	C				0	0	0	0								

Tabelle 1:

Reaktionsstärke bei variiertter Inkubationsdauer und -Temperatur nach der modifizierten Kismeyer-Nielsen Technik. Zusammenstellung der Testergebnisse von 5 Seren mit Lymphozyten von 3 gesunden Spendern (A,B,C). Jedes Serum wurde bei Temperaturstufen von 10, 15, 22 und 37°C und Inkubationsdauer von 1, 2, 3 und 4 Stunden untersucht. Eine Negativkontrolle (AB-Serum) war mitangesetzt. Die Vorinkubationsdauer betrug 30 min, die Vorinkubationstemperatur 22°C. Beurteilung siehe II.1.2.

Tabelle 2

Rate der zerstörten Lymphozyten

S.-Nr.	Lympho	Temp. (°C):			10			15			22			37		
		Dauer (h):			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	A				1	3	4	4	2	4	5	5	2	3	4	4
	B				1	2	3	3	2	4	5	5	2	3	4	4
	C				1	3	3	4	2	3	4	4	2	3	4	4
2	A				0	1	2	2	1	2	3	3	0	1	2	2
	B				0	1	2	3	0	1	3	3	0	1	2	2
	C				1	2	2	2	0	2	2	2	0	0	1	2
3	A				0	1	2	2	1	2	4	4	1	3	3	3
	B				1	2	4	4	2	5	5	5	2	4	5	5
	C				1	2	4	4	2	4	5	5	2	4	4	4
4	A				0	1	2	2	0	2	2	2	0	1	2	2
	B				0	1	2	2	0	1	3	3	0	0	2	2
	C				1	1	2	2	1	1	3	3	0	0	1	2

Rate der zerstörten Lymphozyten

S.-Nr.	Lympho	Temp. (°C):															
		10				15				22				37			
		Dauer (h) :				1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
5	A	0	1	1	1	1	1	3	3	1	1	3	3	1	1	2	2
	B	0	1	2	2	1	2	3	3	1	2	3	3	0	1	2	1
	C	0	1	2	2	1	2	3	3	1	2	3	3	1	1	2	2
neg. Kontr.	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1

Tabelle 2.:

Reaktionsstärke bei variiertter Inkubationsdauer und -Temperatur nach der Methode von Mittel et al. Zusammenstellung der Testergebnisse von 5 Seren mit Lymphozyten von 3 gesunden Spendern (A,B,C). Untersuchung wiederum bei Temperaturstufen von 10, 15, 22 und 37°C und Inkubationsdauer von 1, 2, 3 und 4 Stunden. Eine Negativkontrolle (AB-Serum) war mitangesetzt. Vorinkubationsdauer 30 min, Vorinkubationstemperatur 22°C. Beurteilung siehe II.1.2.

Tabelle 3

S.-ir.	Lympho	Rate der zerstörten Lymphozyten					
		Vorinkubationsdauer (min):	0	15	30	45	50
1	D		2	4	5	5	5
	E		2	4	4	4	4
	F		2	4	4	4	4
2	D		1	2	3	3	3
	E		2	4	4	4	4
	F		1	2	3	3	3
3	D		1	2	4	5	5
	E		2	4	5	5	5
	F		2	3	4	4	4
4	D		1	2	3	3	3
	E		1	2	2	2	2
	F		1	2	3	3	3

S.-Nr.	Lympho	Rate der zerstörten Lymphozyten					
		Vorinkubationsdauer (min):	0	15	30	45	60
5	D		1	2	3	3	3
	E		1	2	3	3	3
	F		2	3	3	3	3

Tabelle 3 :

Reaktionsstärke bei variiertter Vorinkubationsdauer (Zeitraum bis zur Komplementzugabe) nach der Mittal-Methode. Zusammenstellung der Ergebnisse von 5 Seren mit Lymphozyten von 3 gesunden Spendern (D,E,F). Komplementzugabe zu den Testansätzen nach 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten Vorinkubation bei 22°C. Die Inkubationsdauer betrug einheitlich 3 Stunden, die Inkubationstemperatur 15°C.

Tabelle 4

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
1	R.M.	w	69	Diab. mell.	3400	24	1:4	o	o	1:2	o
2	R.A.	w	62	Leberzirrhose	2600	31	1:8	+	o	1:2	2
3	K.K.	w	42	M. Hodgkin	2200	32	1:16	o	o	1:2	o
4	R.K.	m	63	Lymphosarkom	2700	36	1:8	o	o	1:2	o
5	B.O.	m	45	Plasmozytom	3600	23	1:4	o	o	1:2	o
6	G.A.	w	58	Niereninsuff.	2800	30	1:8	o	o	1:2	o
7	S.E.	w	83	Aut. Adenom	2100	29	1:8	o	o	1:2	o
8	S.A.	w	75	Thrombopenie	3700	18	1:4	o	o	1:2	2
9	L.E.	w	93	GI-Blutung	3500	13	1:4	o	o	1:4	o
10	M.J.	m	43	Lungenembolie	3900	8	1:8	o	o	1:2	o
11	F.K.	m	33	Hämoph.A, Hep.B	3800	32	1:16	+	o	1:2	o
12	M.A.	w	40	M. Crohn	3500	51	1:16	o	o	1:2	o
13	R.G.	m	25	Panzytopenie	1700	78	1:8	o	o	1:2	o
14	L.E.	m	52	LE	2400	28	1:16	+	+	1:2	2
15	P.G.	m	73	Prostata Ca	3400	9	1:16	o	o	1:2	o
16	M.K.	w	51	Plasmozytom	3200	22	1:8	o	o	1:2	o
17	S.E.	w	50	Lymphosarkom	2100	16	1:8	o	o	1:2	o
18	W.M.	w	54	Cholelithiasis	2200	31	1:8	o	o	1:2	o

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
19	T.A.	m	44	Cholangitis	3500	31	1:16	0	0	1:2	0
20	H.J.	m	79	Panzytopenie	2100	61	1:4	0	0	1:2	0
21	S.H.	m	34	Leberzirrhose	2700	43	1:4	+	0	1:2	0
22	T.A.	m	42	M. Hodgkin	2200	24	1:4	0	0	1:2	0
23	R.E.	w	52	Plasmozytom	600	24	1:4	0	0	1:2	0
24	K.G.	w	35	M. Hodgkin	3600	18	1:4	0	0	1:2	0
25	J.T.	m	56	Leberzirrhose	1900	22	1:8	(+)	0	1:4	0
26	M.H.	m	68	Lymphosarkom	3700	10	1:8	+	0	1:2	0
27	S.M.	w	50	Lymphosarkom	3800	22	1:4	0	0	1:2	0
28	S.G.	w	69	Lymphosarkom	2100	20	1:4	0	0	1:4	0
29	D.R.	m	15	Mononukleose	3900	11	1:4	0	0	1:2	4
30	I.M.	m	30	Medk. Leukopenie	3600	30	1:64	0	0	1:2	0
31	H.A.	w	79	Herzinsuff.	2100	21	1:4	0	0	1:2	0
32	R.L.	w	63	Hyperthyreose	3900	48	1:4	0	0	1:2	0
33	D.H.	w	45	Ulcus duodeni	3200	25	1:4	0	0	1:2	0
34	S.M.	w	72	Leberzirrhose	3200	36	1:8	0	0	1:2	0
35	P.E.	w	44	Panzytopenie	3700	50	1:32	0	0	1:2	0
36	D.D.	m	38	Niereninsuff.	2800	13	1:8	0	0	1:2	0

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	IE-F	K-aggl	AUTOLOG
37	O.W.	m	54	Lymphosarkom	3600	34	1:8	o	o	1:2	o
38	E.S.	w	72	Leberzirrhose	3900	29	1:4	+	o	1:2	o
39	S.B.	m	31	Chron. Gastritis	2400	16	1:4	o	o	1:2	o
40	J.H.	w	42	M. Hodgkin	3800	17	1:4	o	o	1:2	o
41	A.G.	m	35	Leberzirrhose	2800	13	1:32	+	o	1:2	o
42	H.P.	w	53	Niereninsuff.	2400	20	1:8	o	o	1:2	o
43	M.E.	w	36	Niereninsuff.	3200	28	1:16	o	o	1:2	o
44	H.D.	w	59	Chron Lymphadenose	3000	29	1:8	o	o	1:2	o
45	S.L.	m	68	Myokardinfarkt	3800	19	1:8	o	o	1:2	o
46	B.A.	w	52	Akute Leukose	300	32	1:8	o	o	1:2	o
47	M.I.	w	41	Niereninsuff.	3500	26	1:8	o	o	1:2	o
48	D.D.	w	26	Akute Leukose	1400	—	1:8	o	o	1:2	o
49	J.K.	m	75	Bronchial Ca	3900	13	1:4	o	o	1:2	o
50	G.I.	w	58	Niereninsuff.	2500	11	1:4	o	o	1:2	o
51	P.O.	m	57	Panarteriitis	2400	12	1:4	o	o	1:16	o
52	A.H.	w	35	Medk. Leukopenie	3400	61	1:8	o	o	1:2	o
53	K.A.	w	67	Aut. Adenom	3500	28	1:4	o	o	1:2	o
54	M.S.	w	17	Hyperthyreose	3900	54	1:4	o	o	1:2	o

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
55	M.P.	m	22	Unkl. Infekt	2000	28	1:4	o	o	1:2	o
56	S.M.	w	86	Aplast. Anämie	3300	36	1:32	o	o	1:2	o
57	S.I.	w	31	Myokarditis	3300	46	1:4	o	o	1:2	o
58	R.A.	m	75	Bronchial Ca	2100	24	1:4	o	o	1:2	o
59	L.A.	w	29	Hyperthyreose	2500	36	1:4	o	o	1:2	o
60	H.E.	w	69	Cholostat. Hep.	2500	49	1:4	o	o	1:2	o
61	B.P.	m	21	Perniziösa	2200	41	1:8	o	o	1:2	o
62	M.E.	w	74	Agranulozytose	500	98	1:4	o	o	1:2	4
63	S.R.	w	28	M. Hodgkin	1700	47	1:16	o	o	1:2	o
64	S.E.	w	75	Retikulosarkom	2900	21	1:64 (+)	o	o	1:2	o
65	S.G.	w	58	Leberzirrhose	3600	32	1:8	o	o	1:2	o
66	L.W.	m	40	Leberfibrose	3300	30	1:16	o	o	1:2	o
67	H.A.	m	27	Oberbauchbeschw.	2300	55	1:4	o	o	1:2	o
68	H.C.	w	62	Panzytopenie	1800	33	1:8	o	o	1:2	3
69	H.A.	w	63	Lungenembolie	3600	33	1:8	o	o	1:2	o
70	S.A.	w	75	Chron. Hepatitis	2400	16	1:8	+	o	1:2	o
71	F.H.	m	27	M. Hodgkin	3100	4	1:16	o	o	1:2	o
72	K.A.	w	50	Retikulosarkom	3900	18	1:8	o	o	1:2	o

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
73	C.L.	w	61	Hepatitis B	3200	45	1:8	o	o	1:2	o
74	H.E.	m	61	Lymphosarkom	2700	49	1:64	+	o	1:16	3
75	Z.P.	w	15	Virusinfektion	3200	47	1:8	o	o	1:2	o
76	H.E.	w	75	Leberzirrhose	2000	32	1:16	o	o	1:2	o
77	B.F.	w	64	Chron. Hepatitis	3200	46	1:16	o	o	1:2	o
78	J.P.	w	58	Herzarrhythmie	3700	45	1:4	o	o	1:2	o
79	B.K.	m	71	Leberzirrhose	3800	44	1:8	o	o	1:2	o
80	S.E.	w	21	Cholecholelithiasis	2600	31	1:8	o	o	1:2	o
81	M.E.	w	63	Leberzirrhose	2500	34	1:8	+	o	1:2	o
82	D.A.	w	39	Chr. Pankreatitis	3200	29	1:4	o	o	1:2	o
83	H.G.	m	47	Akute Leukose	900	--	1:4	o	o	1:2	o
84	V.E.	w	46	Chron. Myelose	2500	--	1:4	o	o	1:2	o
85	K.V.	w	46	Ulcus ventriculi	2200	36	1:8	o	o	1:2	o
86	T.K.	w	64	Aut. Adenom	2700	26	1:8	o	o	1:2	o
87	P.M.	w	25	Akute Leukose	1000	68	1:4	o	o	1:2	o
88	B.H.	m	66	Niereninsuff.	1200	25	1:64	+	o	1:2	o
89	S.G.	m	58	Hämolyt. Anämie	3800	14	1:4	o	o	1:16	o
90	B.G.	w	33	Viruspneumonie	3200	36	1:64	(+)	o	1:2	o

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-agg1	AUTOLOG
91	H.G.	w	17	Verd. Kollagenose	2700	15	1:16	+	0	1:2	0
92	L.A.	w	62	Hepatitis B	2800	37	1:8	+	0	1:2	0
93	H.K.	m	35	M. Hodgkin	2600	15	1:4	0	0	1:4	0
94	W.L.	w	64	Agranulozytose	2200	83	1:4	0	0	1:2	0
95	K.K.	m	24	Goodpasture Syndr.	3900	37	1:4	0	0	1:2	0
96	E.K.	w	73	Splenog. Markhemmung	1900	32	1:8	+	0	1:2	0
97	K.K.	m	25	Lobärpneumonie	3700	62	1:8	0	0	1:4	0
98	B.E.	w	49	Plasmozytom	2900	17	1:8	0	0	1:2	0
99	S.K.	w	60	Ovarial Ca	3300	17	1:4	0	0	1:2	1
100	K.M.	m	33	Plasmozytom	3500	31	1:16	0	0	1:2	1
101	R.R.	w	47	Herzinsuff.	2100	32	1:8	0	0	1:2	0
102	W.W.	m	59	Ulcus ventriculi	3400	41	1:32	0	0	1:2	0
103	K.A.	w	81	Barbiturat Intox.	2600	16	1:4	0	0	1:4	3
104	H.K.	w	73	Sepsis	2600	29	1:4	0	0	1:2	0
105	M.E.	w	64	Lungenembolie	3000	16	1:32	0	0	1:4	0
106	S.J.	m	53	Niereninsuff.	3900	20	1:4	0	0	1:2	0
107	K.L.	m	43	IE	1100	20	1:64	+	+	1:2	2
108	L.A.	w	27	Z.n. Herzstillstand	2300	11	1:8	0	0	1:2	0

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
109	G.J.	w	48	Pleuritis carcinom.	3400	24	1:8	o	o	1:2	o
110	H.M.	w	57	Leberzirrhose	2300	25	1:128	+	+	1:2	o
111	B.E.	w	49	Plasmozytom	2200	37	1:4	o	o	1:2	o
112	B.M.	w	73	Niereninsuff.	2200	14	1:4	o	o	1:4	o
113	S.E.	w	75	Myokardinfarkt	3800	—	1:16	o	o	1:2	o
114	R.A.	m	70	Thrombopenie	2700	21	1:8	o	o	1:4	o
115	H.E.	w	55	Myokardinfarkt	3400	15	1:4	+	o	1:2	o
116	J.A.	m	32	Aortenstenose	2300	33	1:8	o	o	1:4	o
117	B.M.	w	64	Plasmozytom	2900	23	1:4	o	o	1:2	o
118	W.M.	w	73	Retikulosarkom	2300	14	1:8	o	(+)	1:4	4
119	K.A.	w	77	Myokardinfarkt	3000	43	1:8	o	o	1:2	o
120	K.E.	w	55	Ovarial Ca	1000	42	1:8	o	o	1:2	o
121	L.E.	w	59	Retikulosarkom	700	22	1:4	o	o	1:2	o
122	C.H.	m	27	Apl. Agranulozytose	3300	28	1:8	o	o	1:4	5
123	S.C.	w	37	Anorexhia nervosa	3500	55	1:8	o	o	1:2	o
124	T.E.	m	59	M. Brill-Symmers	2700	72	1:8	o	o	1:2	o
125	A.I.	w	22	Pneumonie	1500	40	1:8	o	o	1:2	o
126	G.S.	w	25	Oberbauchbeschw.	3000	32	1:32	o	o	1:2	o

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
127	L.E.	m	42	Polycythaemia vera	1900	64	1:64	o	o	1:2	o
128	S.L.	w	67	Virusinfektion	2800	33	1:4	o	o	1:2	o
129	H.H.	m	64	Beinvenenthrombose	3000	34	1:4	o	o	1:2	o
130	K.A.	w	66	Verd. Plasmozytom	2700	30	1:8	o	o	1:2	o
131	W.M.	w	68	Leberzirrhose	3600	32	1:64	+	o	1:2	o
132	S.K.	w	81	Anämie	2500	31	1:32	o	o	1:2	o
133	B.K.	w	72	Rundherd Lunge	3600	32	1:4	o	o	1:2	o
134	D.K.	w	76	Pneumonie	3500	51	1:4	o	o	1:2	o
135	S.A.	w	61	Verschlußikterus	1400	24	1:4	o	o	1:2	o
136	F.M.	w	41	LE	2800	16	1:8	+	+	1:2	3

Tabelle 4 :

Zusammenstellung aller untersuchten Patienten mit Serum-Nummer (Nr.), Initialen (Name), Geschlecht (Sex), Alter und Diagnose. Angabe der Leukozytenzahl (Leuko) pro mm³ Blut; die Lymphozytenzahl (Lympho) ist ausgedrückt in Prozent Lymphozyten des Differentialblutbildes; Titerangabe für Waaler-Rose-Test (ASH) und Kälteagglutinine (K-aggl). Weiter sind aufgeführt der Rheuma-Faktor (R-F) und der Lupus Erythematoses-Faktor (LE-F). In der Spalte AUTOLOG sind die Testergebnisse mit autologen Zellen eingetragen.

Tabelle 5

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-agg1	AUTOLOG
I. Haematologische Erkrankungen											
8	S.A.	w	75	Thrombopenie	3700	18	1:4	o	o	1:2	2
62	M.E.	w	74	Agranulozytose	500	98	1:4	o	o	1:2	4
68	H.C.	w	62	Panzytopenie	1800	33	1:8	o	o	1:2	3
122	C.H.	m	27	Apl. Agranulozytose	3300	28	1:8	o	o	1:4	5
II. Onkologische Erkrankungen											
74	H.E.	m	61	Lymphosarkom	2700	49	1:64	+	o	1:16	3
99	S.K.	w	60	Ovarial Ca	3300	17	1:4	o	o	1:2	1
100	K.M.	m	33	Plasmozytom	3500	31	1:16	o	o	1:2	1
118	W.M.	w	73	Retikulosarkom	2300	14	1:8	o	(+)	1:4	4
III. Kollagenosen											
14	L.E.	m	52	LE	2400	28	1:16	+	+	1:2	2
107	K.L.	m	43	LE	1100	20	1:64	+	+	1:2	2
136	F.M.	w	41	LE	2800	16	1:8	+	+	1:2	3

Nr.	Name	Sex	Alter	Diagnose	Leuko	Lympho	ASH	R-F	LE-F	K-aggl	AUTOLOG
IV. Infektionen											
29	D.R.	m	15	Mononukleose	3900	11	1:4	0	0	1:2	4
V. Leber-, Magen-, Darmerkrankungen											
2	R.A.	w	62	Leberzirrhose	2600	31	1:8	+	0	1:2	2
VI. Intoxikationen											
103	K.A.	w	81	Barbiturat Intox.	2600	16	1:4	0	0	1:4	3

Tabelle 5:

Zusammenstellung der positiven Testergebnisse mit autologen Lymphozyten. Die Patienten sind nach Diagnosegruppen geordnet.

Leukozytenzahl, Prozentsatz der Lymphozyten im Differentialblutbild, Waaler-Rose-Test, Kälteagglutinine, Rheuma-Faktor und Lupus Erythematoses-Faktor sind wie in Tabelle 4 mitangeführt.

In der Spalte AUTOLOG ist die Stärke der Reaktion angegeben.

Tabelle 6

Nr.	Name	Sex	HONOLOG							MLC	
			0	1	2	3	4	5	AUTOLOG	1. Serie	2. Serie
1	R.M.	w	26	2	0	0	0	0	0	143	86
2	R.A.	w	5	10	12	1	0	0	2	107	74
3	K.K.	w	24	4	0	0	0	0	0	164	99
4	R.K.	m	26	2	0	0	0	0	0	102	106
5	B.O.	m	28	0	0	0	0	0	0	86	145
6	G.A.	w	23	2	3	0	0	0	0	133	107
7	S.E.	w	25	2	1	0	0	0	0	101	71
8	S.A.	w	2	2	18	6	0	0	2	187	127
9	L.E.	w	28	0	0	0	0	0	0	62	54
10	M.J.	m	28	0	0	0	0	0	0	120	109
11	F.K.	m	28	0	0	0	0	0	0	110	105
12	M.A.	w	27	1	0	0	0	0	0	75	62
13	R.G.	m	1	1	1	3	4	18	0	49	22
14	L.E.	m	1	1	9	7	8	2	2	171	118
15	P.G.	m	28	0	0	0	0	0	0	118	104
16	N.K.	w	28	0	0	0	0	0	0	189	141
17	S.E.	w	27	1	0	0	0	0	0	85	89
18	W.M.	w	28	0	0	0	0	0	0	179	153

Nr.	Name	Sex	HOMOLOG							MLG	
			0	1	2	3	4	5	AUTOLOG	1. Serie	2. Serie
19	T.A.	m	28	0	0	0	0	0	0	117	92
20	H.J.	m	5	0	1	5	3	14	0	43	21
21	S.H.	m	28	0	0	0	0	0	0	145	80
22	T.A.	m	21	5	2	0	0	0	0	135	87
23	R.E.	w	20	3	4	1	0	0	0	186	117
24	K.G.	w	23	4	1	0	0	0	0	89	41
25	J.T.	m	28	0	0	0	0	0	0	126	94
26	M.H.	m	26	2	0	0	0	0	0	85	103
27	S.M.	w	24	1	1	2	0	0	0	168	125
28	S.G.	w	25	1	1	1	0	0	0	73	28
29	D.R.	m	0	0	0	5	20	3	4	103	88
30	L.M.	m	28	0	0	0	0	0	0	164	119
31	H.A.	w	25	0	2	0	0	1	0	176	95
32	R.L.	w	26	2	0	0	0	0	0	116	81
33	D.H.	w	27	1	0	0	0	0	0	180	105
34	S.M.	w	28	0	0	0	0	0	0	121	114
35	P.E.	w	2	0	2	0	0	24	0	36	44
36	D.D.	m	24	1	3	0	0	0	0	129	161

Nr.	Name	Sex	HOMOLOG					AUTOLOG	MLG	
			0	1	2	3	4	5	1. Serie	2. Serie
37	O.W.	m	21	1	3	3	0	0	152	110
38	S.S.	w	26	2	0	0	0	0	162	141
39	S.B.	m	28	0	0	0	0	0	179	130
40	J.H.	w	28	0	0	0	0	0	142	99
41	A.G.	m	28	0	0	0	0	0	93	74
42	H.P.	w	19	0	0	2	1	6	63	50
43	M.E.	w	27	1	0	0	0	0	129	97
44	H.D.	w	25	1	1	1	0	0	152	88
45	S.L.	m	28	0	0	0	0	0	140	82
46	B.A.	w	24	1	2	1	0	0	68	25
47	M.I.	w	12	0	3	1	5	7	47	38
48	D.D.	w	5	0	1	2	4	16	40	21
49	J.K.	m	27	1	0	0	0	0	154	109
50	G.I.	w	25	1	1	1	0	0	125	70
51	P.O.	m	27	1	0	0	0	0	124	141
52	A.H.	w	11	1	4	12	0	0	142	122
53	K.A.	w	18	2	6	2	0	0	134	61
54	M.S.	w	27	1	0	0	0	0	135	104

Nr.	Name	Sex	HOMOLOG							MLC	
			0	1	2	3	4	5	AUTOLOG	1. Serie	2. Serie
55	M.P.	m	28	0	0	0	0	0	0	144	94
56	S.M.	w	5	3	7	7	1	5	0	53	40
57	S.I.	w	26	2	0	0	0	0	0	121	89
58	R.A.	m	28	0	0	0	0	0	0	156	92
59	L.A.	w	19	0	1	3	3	2	0	158	87
60	H.E.	w	28	0	0	0	0	0	0	156	103
61	B.P.	m	28	0	0	0	0	0	0	145	86
62	M.F.	w	0	0	0	10	14	4	4	78	72
63	S.R.	w	26	2	0	0	0	0	0	135	86
64	S.E.	w	22	2	2	1	1	0	0	44	10
65	S.G.	w	28	0	0	0	0	0	0	111	78
66	L.W.	m	27	1	0	0	0	0	0	107	92
67	H.A.	m	28	0	0	0	0	0	0	102	71
68	H.G.	w	0	0	2	20	4	2	3	58	35
69	H.A.	w	28	0	0	0	0	0	0	156	94
70	S.A.	w	28	0	0	0	0	0	0	98	70
71	F.H.	m	26	2	0	0	0	0	0	180	117
72	K.A.	w	22	1	5	0	0	0	0	127	89

Nr.	Name	Sex	HOMOLOG					AUTOLOG	FLC	
			0	1	2	3	4	5	1. Serie	2. Serie
73	C.L.	w	26	1	1	0	0	0	142	129
74	H.E.	m	0	1	5	21	1	0	110	83
75	Z.P.	w	28	0	0	0	0	0	132	94
76	H.E.	w	22	0	3	1	1	1	106	88
77	B.F.	w	25	2	1	0	0	0	141	100
78	J.P.	w	28	0	0	0	0	0	156	107
79	B.K.	m	28	0	0	0	0	0	117	71
80	S.E.	w	28	0	0	0	0	0	131	90
81	M.E.	w	0	0	0	3	2	23	152	127
82	D.A.	w	27	1	0	0	0	0	102	84
83	H.G.	m	26	2	0	0	0	0	118	108
84	V.E.	w	0	0	3	3	3	19	31	6
85	K.V.	w	21	0	1	5	0	1	42	28
86	T.K.	w	28	0	0	0	0	0	168	111
87	P.M.	w	27	1	0	0	0	0	112	84
88	B.H.	m	27	1	0	0	0	0	95	77
89	S.G.	m	18	2	5	3	0	0	95	123
90	B.G.	w	28	0	0	0	0	0	143	111

Nr.	Name	Sex	HOMOLOG							MLC	
			0	1	2	3	4	5	AUTOLOG	1. Serie	2. Serie
91	H.G.	w	25	1	2	0	0	0	0	157	96
92	L.A.	w	25	3	0	0	0	0	0	93	77
93	H.K.	m	21	1	4	1	0	1	0	129	101
94	W.L.	w	0	0	1	3	18	6	0	76	80
95	K.K.	m	27	1	0	0	0	0	0	81	89
96	E.K.	w	27	1	0	0	0	0	0	110	106
97	K.K.	m	28	0	0	0	0	0	0	109	82
98	B.E.	w	25	2	1	0	0	0	0	120	91
99	S.K.	w	6	10	10	2	0	0	1	134	96
100	K.M.	m	11	13	4	0	0	0	1	126	116
101	R.R.	w	26	1	1	0	0	0	0	121	107
102	W.W.	m	16	4	1	4	2	1	0	94	100
103	K.A.	w	1	1	2	23	1	0	3	118	79
104	H.K.	w	28	0	0	0	0	0	0	99	71
105	M.E.	w	25	2	1	0	0	0	0	97	104
106	S.J.	m	28	0	0	0	0	0	0	126	80
107	K.L.	m	3	4	19	2	0	0	2	46	42
108	L.A.	w	20	1	4	3	0	0	0	78	92

Nr.	Name	Sex	HONOLOG							MLC	
			0	1	2	3	4	5	AUTOLOG	1. Serie	2. Serie
127	L.E.	m	28	0	0	0	0	0	0	126	78
128	S.L.	w	20	2	2	4	0	0	0	44	51
129	H.H.	m	27	1	0	0	0	0	0	87	93
130	K.A.	w	28	0	0	0	0	0	0	108	86
131	W.M.	w	27	1	0	0	0	0	0	86	83
132	S.K.	w	23	5	0	0	0	0	0	139	99
133	B.K.	w	28	0	0	0	0	0	0	157	131
134	D.K.	w	28	0	0	0	0	0	0	119	126
135	S.A.	w	19	2	3	2	1	1	0	56	72
136	F.M.	w	2	7	13	6	0	0	3	135	116

Legende zu Tabelle 6:

Zusammenstellung der Testergebnisse bei Untersuchung der gesammelten 136 Seren mit homologen Lymphozyten. Außerdem ist in der Tabelle die Beeinflussung der MLC-Reaktion durch Inkubation mit dem entsprechenden Serum aufgeführt.

Die Serum-Nummern entsprechen denen der Tabelle 4. Jedes Serum wurde mit 28 Lymphozytensorten getestet. Unter HOMOLOG ist angegeben, mit welcher Anzahl Zell-sorten das Serum in der oben aufgetragenen Reaktions-stärke reagierte. In der Spalte AUTOLOG sind zum Ver-gleich die Befunde bei Testung mit autologen Zellen eingetragen.

Jedes Serum wurde in zwei Versuchsreihen (1. Serie und 2. Serie) auf seine Beeinflussung der MLC-Re-aktion untersucht. Die Ergebnisse sind in Prozent der Reaktionsstärke zu einem Vergleichsserum (AB-Serum für die MLC) ausgedrückt.

Tabelle 7

	Gruppe A n= 89		Gruppe B n= 14		Gruppe C n= 33	
	1	2	1	2	1	2
$\bar{x}$	127,7	96,7	113,1	86,4	96,0	70,8
s	15,99	23,97	39,54	28,67	48,13	37,92
VK	12,5%	24,8%	35,1%	33,2%	50,1%	53,5%

A= keine Antikörper

B= lymphozytotoxische Autoantikörper

C= HL-A Antikörper

1,2= unterschiedliche Lymphozyten-Paare

$\bar{x}$ = Mittelwert

s= Standardabweichung

VK= Vertrauenskoeffizient

Tabelle 7: Inhibition der MLC. Vergleich der Mittelwerte in den einzelnen Gruppen.

7. LITERATURVERZEICHNIS.

- 1 Abdou, N.I., Abdou, N.L.
Bone marrow: The bursa equivalent in man?
Science 175, 446 (1972)
- 2 Ahrons, S., Glavind-Kristensen, S.
Cytotoxic HL-A antibodies: Immunoglobulin
classification.
Tissue Antigens 1, 129 (1971)
- 3 Albertini, R.J., Bach, F.H.
Quantitative assay of antigenic disparity at
HL-A - the major histocompatibility locus in man.
J. exp. Med. 128, 639 (1968)
- 4 Amos, D.B.
The agglutination of leukocytes by immune sera.
Brit. J. exp. Path. 34, 464 (1953)
- 5 Bach, F.H., Hirschhorn, K.
Lymphocyte interaction: A potential histo-
compatibility test in vitro.
Science 143, 3608 (1964)
- 6 Bach, F.H., Voynow, N.K.
One-way stimulation in mixed leukocyte cultures.
Science 153, 545 (1966)
- 7 Bach, J.F.
Evaluation of T-cells and thymic serum factors
in man using the rosette-technique.
Transplant. Rev. 16, 196 (1973)

- 8 Bach, M.L., Solliday, S., Stambuk, M.
Detection of disparity in the mixed leukocyte
culture test: A more rapid assay.
Histocompatibility Testing, Ed. Munksgaard,
Copenhagen 1970, S. 643
- 9 Bain, B., Vas, M.R., Lowenstein, L.
The development of large immature mononuclear
cells in mixed leukocyte culture.
Blood 23, 1 (1964)
- 10 Baxley, G., Bishop, G.B., Cooper, A.G., Wortis, H.H.
Rosetting of human red blood cells to thymocytes
and thymus-derived cells.
Clin. exp. Immunol. 15, 385 (1973)
- 11 Böyum, A.
Separation of leukocytes from blood and bone
marrow.
Scand. J. clin. lab. Invest. 21, Suppl. 97 (1968)
- 12 Bouroncle, B.A., Malspesis, L., Aschenbrand, J.F.
Factors affecting the quantitative evaluation of
uni- and bidirectional reactions of mixed leuko-
cyte cultures.
Amer. J. clin. Path. 58, 17 (1972)
- 13 Brand, D.L., Ray, J.G.jr., Hare, D.B.
Kayhoe, D.E., McClelland, J.D.
Preliminary trials toward standardization of
leukocyte typing.
Histocompatibility Testing, Ed. Munksgaard,
Copenhagen 1970, S. 357

- 14 Brittingham, P.E., Chaplin jr., H.
Febrile transfusion reactions caused by sensitivity to donor leukocytes and platelets.
JMA 155, 819 (1957)
- 15 Brody, J.A., Huntley, B.
Human lymphocytes cultured in micro-plates.
Nature (London) 208, 1232 (1965)
- 16 Brooks, W.H., Netsky, M.G., Normansell, D.E., Horwitz, D.A.
Depressed cell-mediated immunity in patients with primary intracranial tumors.
J. exp. Med. 136, 1631 (1972)
- 17 Buckley, R.H., Schiff, R.I., Amos, D.B.
Blocking of autologous and homologous leukocyte responses by human alloimmune plasmas: A possible in vitro correlate of enhancement.
J. Immunol. 108, 34 (1972)
- 18 Burnet, F.M.
The clonal selection theory of acquired immunity.
Cambridge University Press, London 1958
- 19 Burnet, F.M.
A reassessment of the forbidden clone hypothesis of autoimmune disease.
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 50, 1 (1972)
- 20 Butler, W.T., Sharp, J.T., Rossen, R.D., Lidsky, M.D., Mittal, K.K., Gard, D.A.
Relationship of the clinical course of systemic lupus erythematosus to the presence of circulating lymphocytotoxic antibodies.
Arthritis and Rheumatism 15, 231 (1972)

- 21 Campbell, R.C.
Statistische Methoden für Biologie und Medizin.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971
- 22 Ceppellini, R., Bonnard, G.D., Coppo, F.,
Miggiano, V.G., Pospisil, M., Curtoni, B.S.,
Pellegrino, M.
Mixed leukocyte cultures and HL-A antigens:
II. Inhibition by anti-HL-A sera.
Transpl. Proc. 2, 63 (1971)
- 23 Cohen, G.
Funktion und Oberflächenmarker menschlicher
T- und B-Lymphozyten.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2241 (1974)
- 24 Cohen, I.R., Globerson, A., Feldmann, M.
Autosensitization in vitro.
J. exp. Med. 133, 821 (1971)
- 25 Cohen, I.R., Wekerle, H.
Regulation of autosensitization. The immune
activation and specific inhibition of self-re-
cognizing thymus-derived lymphocytes.
J. exp. Med. 137, 224 (1973)
- 26 Cohen, S., Milstein, C.
Structure and biological properties of immuno-
globulins.
Advanc. Immunol. 7, 1 (1967)
- 27 Cohn, Z.A.
The structure and function of monocytes and
macrophages.
Advanc. Immunol. 2, 164 (1968)

- 28 Coombs, R.R.A., Franks, D.
Immunological reactions involving two cell types.
Progr. Allergy 13, 174 (1969)
- 29 Cousar, J.B., Horwitz, D.A.
Inhibition of lymphocyte activation by sera of
patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis and Rheumatism (Abstract) 16, 539 (1973)
- 30 Craddock, C.G., Longmire, R., Mc Millan, R.
Lymphocytes and the immune response.
New Engl. J. Med. 285, 324 (1971)
- 31 Crome, P., Moffatt, B.
IgM lymphocytotoxic antibodies following multiple
transfusions.
Vox Sang. 21, 11 (1971)
- 32 Dausset, J.
Iso-leuco-anticorps.
Acta haemat. (Basel) 20, 156 (1958)
- 33 Dausset, J., Brecy, H.
Test direct de consommation de l'antiglobuline
sur les leucocytes et les plaquettes de certaines
malades atteinte de pancytopenies idiopathiques.
Vox Sang. (Basel) 2, 197 (1958)
- 34 Dausset, J., Colombani, J., Colombani, M.
Study of leukopenias and thrombocytopenias by
direct antiglobulin consumption test on leuko-
cytes and/or platelets.
Blood 18, 672 (1961)

- 35 Dausset, J., Ivanyi, P., Ivanyi, D.
Tissue alloantigens in humans. Identification
of a complex system (Hu-1).
Histocompatibility Testing, Ed. Munksgaard,
Copenhagen 1965, S. 51
- 36 De Weck, A.L.
Was ist ein Antigen?
Dtsch. med. Wschr. 92, 122 (1967)
- 37 Dickler, H.B., Kunkel, H.G.
Interaction of aggregated μ -globulin with
B lymphocytes.
J. exp. Med. 136, 191 (1972)
- 38 Dossetor, J.B., Olson, L.A.
Evidence of latent sensitization to HL-A antigens.
Transplantation 13, 576 (1972)
- 39 Du Bois, M.J.G.J., Huismans, D.R., Schellekens,
P.Th.A., Eijssvoogel, V.P.
Investigation and standardization of the con-
ditions for micro-lymphocyte cultures.
Tissue Antigens 2, 402 (1973)
- 40 Dupont, B., Andersen, V., Hansen, G.S.,
Svejgaard, A.
Abnormal mixed lymphocyte reactions in the
family of a patient with severe combined immuno-
deficiency.
Transplantation 14, 557 (1972)
- 41 Editorial Lancet
The lymphocyte.
Lancet 1, 409 (1973)

- 42 Editorial Lancet
Immune neutropenia.
Lancet 1, 24 (1976)
- 43 Engelfriet, G.P., Loghem, J.J.V.
Studies on leukocyte iso- and auto-antibodies.
Brit. J. Haemat. 7, 223 (1961)
- 44 Engelhardt, A., Lommel, H. (Herausgeber)
Methodische Fortschritte im medizinischen
Laboratorium. Band 1: Serumproteine.
Verlag Chemie, Weinheim 1974
- 45 Fanger, M.W., Bernier, G.M.
Subpopulations of human lymphocytes defined by
 β_2 -microglobulin.
J. Immunol. 111, 609 (1973)
- 46 Feldmann, M., Cohen, I.R., Wekerle, H.
T-cell mediated immunity in vitro:
An analysis of antigen recognition and target
cell lysis.
Transplant. Rev. 12, 57 (1972)
- 47 Fröland, S., Natvig, J.B., Berdal, P.
Surface-bound immunoglobulin as a marker of
B lymphocytes in man.
Nature New Biol. 234, 251 (1971)
- 48 Ganong, W.F.
Lehrbuch der Medizinischen Physiologie.
Springer-Verlag, 3.A. 1974
- 49 Grifoni, V., Del Giacco, G.S., Marconi, P.E.
Lymphocytotoxins in Hodgkin's disease.
Ital. J. Immunol. 1, 21 (1970)

- 50 Grumet, F.C., Leventhal, B.G.
Inhibition of the response in mixed leukocyte
cultures by alloimmune plasma.
Transplantation 9, 405 (1970)
- 51 Han, T., Sokal, J.E.
Lymphocyte response to phytohaemagglutinin in
Hodgkin's disease.
Amer. J. Med. 48, 728 (1970)
- 52 Hartzmann, R.J., Bach, M.L., Bach, F.H.,
Thurman, G.B., Sell, K.W.
Precipitation of radioactively labeled samples:
A semiautomatic multiple sample processor.
Cell. Immunol. 4, 182 (1972)
- 53 Hartzmann, R.J., Segall, M., Bach, M.L.,
Bach, F.H.
Histocompatibility matching. VI. Miniaturization
of the mixed leukocyte test: A preliminary re-
port.
Transplantation 11, 268 (1971)
- 54 Hedberg, H., Källén, B., Löw, B., Nilsson, O.
Impaired mixed leukocyte reaction in some
different diseases, notably multiple sclerosis
and various arthritides.
Clin. exp. Immunol. 9, 201 (1971)
- 55 Hirschhorn, K., Bach, F.H., Kolodny, R.L.,
Firschein, I.L., Hashem, N.
Immune response and mitosis of human peripheral
blood lymphocytes in vitro.
Science 142, 3596 (1963)

- 56 Humphrey, J.H., White, R.G.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1971
- 57 Jondal, M., Klein, G.
Surface markers on human T and B lymphocytes.
II. Presence of Epstein-Barr-virus receptors
on B lymphocytes.
J. exp. Med. 138, 1365 (1973)
- 58 Kaliss, N., Molomut, N.
The effect of prior injections of tissue anti-
serums on the survival of cancer homoiografts
in mice.
Cancer Res. 12, 110 (1952)
- 59 Kissmeyer-Nielsen, F., Kjerbye, D.E.
Lymphocytotoxic micro-technique. Purification
of lymphocytes by flotation.
Histocompatibility Testing, Ed. Munksgaard,
Copenhagen 1967, S. 381
- 60 Klingelhöfer, H.L.
Lymphocytotoxische Autoantikörper bei Autoimmun-
erkrankungen.
Inaugural-Dissertation, Marburg 1975
- 61 Klingelhöfer, H.L., Malchow, H., Havemann, K.,
Börngen, U.
Lymphocytotoxische Antikörper bei Autoimmuner-
krankungen.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, 884 (1972)

- 62 Kreisler, M., Naito, S., Terasaki, P.I.
Cytotoxins in disease. V. Various diseases.
Transpl. Proc. 3, 112 (1971)
- 63 Lies, R.B., Messner, R.P., Williams jr., R.C.
Relative T-cell specificity of lymphocytotoxins
from patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis and Rheumatism 16, 369 (1973)
- 64 Lueker, R.D., Williams jr., R.C.
Decreased reactivity of lymphocytes in mixed-
leukocyte culture from patients with rheumatic
fever.
Circulation 46, 655 (1972)
- 65 Mackaness, G.B., Blanden, R.V.
Cellular immunity.
Progr. Allergy 11, 89 (1967)
- 66 Malchow, H.
Arbeitsanleitung: Lymphozytenmischkultur (MLC).
Workshop 3. Tagung der Gesellschaft für Immuno-
logie, Marburg, 11.-13. 10. 1971
- 67 Malchow, H.
Inhibierende humorale und celluläre Mechanismen
in der Erkennung von unterschiedlichen Trans-
plantationsantigenen bei Autoimmun- und lympho-
proliferativen Erkrankungen.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, 892 (1972)
- 68 Malchow, H., Horstkamp, B., Johannsen, R.,
Schmidt, W., Havemann, K.
Zur Spezifität lymphozytotoxischer Antikörper.
Serologische und chemische Eigenschaften. Der Ein-
fluß der Autoantikörper auf Lymphozytenmischkultur
(MLC) und Lymphozytenkultur.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, 1623 (1974)

- 69 Malchow, H., Klingelhöfer, H.L., Johannsen, R.
Zur Spezifität lymphozytotoxischer Antikörper.
Analyse der Patienten mit positiven zytotoxischen
Reaktionen auf homologe Lymphozyten.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, 1586 (1974)
- 70 Malchow, H., Klingelhöfer, H.L., Rau, B.,
Tücke, M., Himmelmann, G.
Häufigkeit und Vorkommen lymphocytotoxischer Anti-
körper und Autoantikörper in einem unausgewählten
und einem ausgewählten Krankengut.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 590 (1973)
- 71 Malchow, H., Sodomann, C.-P.
Die klinische Bedeutung von in vitro-Methoden zum
Nachweis einer cellulären Immunität.
Internist (Berlin) 13, 66 (1972)
- 72 Marchalonis, J.J., Atwell, J.L., Cone, R.E.
Isolation of surface immunoglobulin from lympho-
cytes from human and murine thymus.
Nature New Biol. 235, 240 (1972)
- 73 Michael, S.R., Vural, L.L., Bassen, F.A.
The hematologic aspects of disseminated (systemic)
lupus erythematosus.
Blood 6, 1059 (1951)
- 74 Michlmayr, G., Asamer, H., Huber, C., Huber, H.
Antikörper gegen autologe Lymphozyten bei Lupus
erythematoses (LE).
Klin. Wschr. 50, 484 (1972)
- 75 Michlmayr, G., Huber, H.
Receptor sites for complement on certain human
peripheral blood lymphocytes.
J. Immunol. 105, 670 (1970)

- 76 Miescher, P.
Leucopénie chronique par "auto-anticorps".
Acta haematol. 11, 152 (1954)
- 77 Mittal, K.K., Mickey, M.R., Singal, D.P.,
Terasaki, P.I.
Serotyping for homotransplantation.
XVIII. Refinement of microdroplet lymphocyte
cytotoxicity test.
Transplantation 6, 913 (1968)
- 78 Mittal, K.K., Rossen, R.D., Sharp, J.T.,
Lidsky, M.D., Butler, W.T.
Lymphocyte cytotoxic antibodies in systemic lupus
erythematosus.
Nature (London) 225, 1255 (1970)
- 79 Mottironi, V.D., Terasaki, P.I.
Lymphocytotoxins in disease'.
I. Infectious mononucleosis, rubella, and measles.
Histocompatibility Testing, Ed. Munksgaard,
Copenhagen 1970, S. 301
- 80 Müller-Eberhard, H.J.
Chemistry and reaction mechanisms of complement.
Advanc. Immunol. 8, 2 (1968)
- 81 Nagel, G.A., Holland, J.F.
The mixed lymphocyte tumor cell culture and
fluorescein diacetate cytotoxicity test. Two
useful methods for the demonstration of cell me-
diated tumor specific immunity in man.
Acta haematol. (Basel) 44, 129 (1970)
- 82 Naito, S., Mickey, M.R., Hirata, A., Terasaki, P.I.
Autolymphocytotoxins following immunization by
pregnancy.
Tissue Antigens 1, 219 (1971)

- 83 Niederländische Gesellschaft für Immunologie
Einführung in die Immunologie.
UTB Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1972
- 84 Nossal, G.J.V.
Mechanism of antibody production.
Ann. Rev. Med. 18, 81 (1967)
- 85 Ooi, B.S., Orlina, A.R., Pesce, A.J., Mendoza, N.,
Masaitis, L., Pollak, V.E.
Lymphocytotoxic antibodies in patients with
systemic lupus erythematosus.
Clin. exp. Immunol. 17, 237 (1974)
- 86 Opelz, G., Mickey, M.R., Terasaki, P.I.
Blood transfusions and unresponsiveness to HL-A.
Transplantation 16, 649 (1973)
- 87 Papamichail, M., Brown, J.C., Holborow, E.J.
Immunoglobulins on the surface of human lympho-
cytes.
Lancet 2, 850 (1971)
- 88 Parker, J.W., Lukes, R.J.
A microculture method for lymphocyte transfor-
mation studies in the clinical laboratory.
Amer. J. clin. Path. 56, 174 (1971)
- 89 Payne, R., Rolfs, M.
Fetomaternal leukocyte incompatibility.
J. Clin. Invest. 37, 1756 (1958)
- 90 Polet, H.
The mixed lymphocyte culture as a tool for the
quantitative determination of HL-A differences.
Transplantation 13, 472 (1972)

- 91 Râdel, J., Dooren, L.J., Eijsvogel, V.P.,
VanWent, J.J., Hijmans, W.
An immunological study during post-transplan-
tation follow-up of a case of severe continued
immunodeficiency.
Clin. exp. Immunol. 10, 367 (1971)
- 92 Raff, M.C.
T and B lymphocytes and immune responses.
Nature New Biol. 242, 19 (1973)
- 93 Raff, M.C., de Petris, S.
Movement of lymphocyte surface antigens and re-
ceptors. The fluid nature of the lymphocyte
plasma membrane and its immunological signifi-
cance.
Fed. Proc. 32, 48 (1973)
- 94 Revillard, J.P., Betuel, H., Robert, M.
Effects of alloantibodies on lymphocyte proli-
feration in vitro.
Cell. Immunol. 8, 339 (1973)
- 95 Rosenberg, S.A., Rogentine jr., G.N.
Natural human antibodies to "hidden" membrane
components.
Nature New Biol. 239, 203 (1972)
- 96 Rowley, D.
Phagocytosis.
Advanc. Immunol. 2, 241 (1962)
- 97 Sachs, L.
Statistische Auswertungsmethoden.
Springer Verlag, 1972, S. 269

- 98 Schellekens, P.T.A., Eijssvoegel, V.P.
Lymphocyte transformation in vitro.
I. Tissue culture conditions and quantitative
measurements.
Clin. exp. Immunol. 3, 571 (1968)
- 99 Schettler, G. (Herausgeber)
Innere Medizin.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1972
- 100 Shaw, J.F.
Lymphocytotoxins in lupus erythematosus.
Ala. J. Med. Sci. 8, 210 (1971)
- 101 Siegenthaler, W. (Herausgeber)
Klinische Pathophysiologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1976
- 102 Stastny, P., Ziff, M.
Antibodies against cell membrane constituents in
systemic lupus erythematosus and related diseases.
I. Cytotoxic effect of serum from patients with
systemic lupus erythematosus (SLE) for allogeneic
and for autologous lymphocytes.
Clin. exp. Immunol. 8, 553 (1971)
- 103 Stastny, P., Ziff, M.
Direct lysis of lymphocytes by complement in
patients with systemic lupus erythematosus.
Arthritis and Rheumatism 14, 733 (1971)
- 104 Steffen, C.
Allgemeine und experimentelle Immunologie und
Immunpathologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1968

- 105 Terasaki, P.I., McClelland, J.D.
Microdroplet assay of human serum cytotoxins.
Nature (London) 204, 998 (1964)
- 106 Terasaki, P.I., Mottironi, V.D., Barnett, E.V.
Cytotoxins in disease.
II. Autocytotoxins in lupus.
New Engl. J. Med. 283, 724 (1970)
- 107 Thorsby, E., Bondevik, H., Solheim, B.G.
The inhibitory effect of HL-A antibodies on
lymphocyte transformation in vitro.
Transpl. Proc. 5, 343 (1973)
- 108 Thorsby, E., Bratlie, A.
A rapid method for preparation of pure lympho-
cyte suspensions.
Histocompatibility Testing, Ed. Munksgaard,
Copenhagen 1970, S. 655
- 109 Thurman, G.B., Strong, D.M., Ahmed, A.,
Green, S.S., Sell, K.W., Hartzman, R.J., Bach, F.H.
Human mixed lymphocyte cultures. Evaluation of a
microculture technique utilizing the Multiple
Automated Sample Harvester (MASH).
Clin. exp. Immunol. 15, 289 (1973)
- 110 Tongio, M.M., Berrebi, A., Mayer, S.
A study of lymphocytotoxic antibodies in multi-
parous women having had at least four pregnancies.
Tissue Antigens 2, 378 (1972)
- 111 Vitetta, E.S., Uhr, J.W.
Synthesis, transport, dynamics and fate of cell
surface Ig and alloantigens in murine lympho-
cytes.
Transplant. Rev. 14, 50 (1973)

- 112 Wagner, R.
Interferon.
Am. J. Med. 38, 726 (1965)
- 113 Warnatz, H.
Tumorimmunologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1975
- 114 Wekerle, H., Cohen, I.R., Feldmann, M.
Selbst-Toleranz und Autoimmunität.
Dtsch. med. Wschr. 99, 1734 (1974)
- 115 Wernet, P., Fotino, M., Thoburn, R., Moore, A.,
Kunkel, H.G.
Blockage of lymphocyte surface antigens and the
shedding phenomenon in systemic lupus erythema-
tosis (SLE).
Arthritis and Rheumatism (Abstr.) 16, 137 (1973)
- 116 Wernet, P., Kunkel, H.G.
Antibodies to a specific antigen of T cells in
human sera inhibiting mixed leukocyte culture
reactions.
J. exp. Med. 138, 1021 (1973)
- 117 Wigzell, H.
The functional significance of surface structures
on lymphocytes.
Ann. Immunol. 124c, 7 (1973)
- 118 Williams jr., R.C., Emmons, J.D., Yunis, E.J.
Studies of human sera with cytotoxic activity.
J. Clin. Invest. 50, 1514 (1971)

- 119 Williams jr., R.C., Lies, R.B., Messner, R.P.
Inhibition of mixed leukocyte culture responses
by serum and γ -globulin fractions from certain
patients with connective tissue disorders.
Arthritis and Rheumatism 16, 597 (1973)
- 120 Yankee, R.A., Grumet, F.C., Rogentine, G.N.
Platelet transfusion therapy: The selection of
compatible platelet donors for refractory
patients by lymphocyte HL-A typing.
New Engl. J. Med. 281, 1208 (1969)

Danksagung

Die Anregung zu dieser Arbeit ging von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H. Malchow aus, dem ich für die bereitwillige Unterstützung zu großem Dank verpflichtet bin.

Ebenso möchte ich den Damen Frau C. Hoss und Frau C. von Taboritzki für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche herzlich danken.

Lebenslauf

Am 29. Mai 1950 wurde ich, Gerhard Moldenhauer, als zweites Kind des Arztes Dr. med. Gerhard Moldenhauer und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Herwig, in Arolsen geboren. Mein Vater war 2 Monate vor meiner Geburt verstorben.

Im April 1956 wurde ich in die Freie Waldorfschule in Marburg eingeschult, wo ich nach 13-jähriger Schulzeit im Februar 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1969 nahm ich an der Philipps-Universität Marburg/Lahn das Studium der Humanmedizin auf. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich nach dem Sommersemester 1970, die ärztliche Vorprüfung nach dem Wintersemester 1971/72. Die ärztliche Prüfung legte ich im August 1975 vor der Prüfungsausschuß in Marburg ab.

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arndt, Aurich, Bode, Bommer, Braasch, Buchholz, Daume, Dehnicke, Dimroth, Dölle, Dombrowski, Engelhardt, Eschenbach, Exner, Friederich, Ganz, Golenhofen, Graul, Grundner, Haberich, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Hensel, Hering, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Jacob, Kaffarnik, Karle, Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser, Koecke, Koransky, Kühnel, Linneweh, Lütcke, Martini, Nassarrat, Niemeyer, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schaumlöffel, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Schneider, Seidel, Siegert, Solcher, Uhlarik, Walcher, Wehrmeyr, Wesemann.

